



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

Joana Margarida
Duarte Pedrosa

**SUSCEPTIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS*
À CASPOFUNGINA E MUTAÇÕES DE *FKS1***



**Joana Margarida
Duarte Pedrosa**

**SUSCEPTIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS*
À CASPOFUNGINA E MUTAÇÕES DE *FKS1***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Prof.^a Doutora Teresa Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e co-orientação científica do Prof. Doutor Manuel Santos, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri
Presidente

Prof^a. Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa
Professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Prof^a. Doutora Teresa Maria Fonseca de Oliveira Gonçalves
Professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Manuel António da Silva Santos
Professor associado Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho.

À Prof.^a Teresa, por me ter possibilitado a realização deste trabalho e pela orientação prestada, expresso o meu agradecimento.

Ao Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra pela disponibilidade de espaços e equipamentos que me permitiram avançar rapidamente na realização deste trabalho.

Ao grupo do MMYRG gostaria de agradecer o apoio que me deram, em especial à Alexandra, à Chantal e à Branca por toda a paciência que tiveram.

À minha amiga Marta, pelas sugestões cheias de sabedoria e experiência!

Ao pessoal da Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra que me apoiou em tudo o que eu precisei, muito obrigada.

Aos meus pais, por todo o carinho.

Ao Henrique, pelo apoio incondicional, do início até ao fim.

PALAVRAS-CHAVE

Candida albicans, resistência, sensibilidade, Equinocandinas, Caspofungina, Mutações *FKS1*, HS1, HS2.

RESUMO

A incidência e a prevalência de infecções fúngicas invasivas com comprometimento de vida são um grave problema de saúde humana e, não obstante dos tratamentos antifúngicos agressivos bem estabelecidos ou com novos fármacos, estas infecções são uma causa importante de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Dentro do género *Candida*, *Candida albicans* continua a ser a espécie mais frequentemente associada a infecções fúngicas graves.

As equinocandinas tornaram-se a terapia de primeira linha no tratamento de candidíases invasivas no entanto, alguns estudos relatam o aparecimento de susceptibilidade reduzida a estes agentes, especialmente à Caspofungina, o antifúngico desta classe mais largamente usado. Sabe-se que mutações, em duas regiões altamente conservadas, no gene que codifica a subunidade Fks1 do complexo glucano-sintase originam valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) anormalmente elevados.

O objectivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade à Caspofungina, pelo método de microdiluição, de um grupo de 25 isolados clínicos de *C. albicans*, recolhidos entre 2005 e 2011. A extracção de DNA e sequenciação das regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1* foi executada nas estirpes com valores de CIM de 0,25 µg/ml, para avaliar a presença ou ausência de mutações nessas regiões. Das seis estirpes sequenciadas, uma apresenta uma mutação V636G por alteração do nucleótido T pelo nucleótido G na posição 1905, uma apresenta um polimorfismo por alteração do nucleótido C pelo nucleótido T na posição 1921, e outra amostra apresenta um polimorfismo na posição 1927 por alteração do nucleótido T pelo nucleótido A, um polimorfismo pela troca do nucleótido T pelo nucleótido G na posição 1881 e uma mutação F628C pela alteração do nucleótido T pelo nucleótido G na posição 1883, todas para a

região HS1. Para a região HS2 não foram encontradas mutações nem polimorfismos.

KEYWORDS

Candida albicans, resistance, susceptibility, Equinocandins, Caspofungin, FKS1 mutations, HS1, HS2.

ABSTRACT

The incidence and prevalence of invasive fungal infections are a serious life threatening human health problem and, despite established aggressive antifungal treatments or with novel drugs, these infections are a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised individuals. Within the genus *Candida*, *Candida albicans* remains the species most often associated with severe fungal infections.

The echinocandins have become first-line therapy in the treatment of invasive candidiasis. However, some studies have reported the emergence of reduced susceptibility to these agents, especially to Caspofungin, the most widely used antifungal agent in this class. It is known that mutations in two highly conserved regions in the gene that encodes the subunit of the complex Fks1 glucan synthase results in Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values abnormally high.

The aim of this study was to evaluate the susceptibility to Caspofungin, by the method of broth microdilution, in a group of 25 clinical isolates of *Candida albicans*, collected between 2005 and 2011. The DNA extraction and sequencing of the *FKS1* gene was performed in strains with MIC values of 0,25 µg/ml to assess the presence or absence of mutations HS1 and HS2. Among the six strains studied, one shows a V636G mutation by a T to G change at nucleotide 1905, one has a C to T polymorphism at nucleotide 1921 and another sample has a T to A polymorphism at nucleotide 1927, a T to G polymorphism at nucleotide 1881 and a F628C mutation changing a T to G at nucleotide 1883, all for the HS1 region. For the HS2 region no mutations/polymorphisms were found.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
INTRODUÇÃO	18
Os Fungos	19
<i>Candida sp.</i>	20
Infecções Fúngicas por Espécies de <i>Candida</i>	21
Patogénese de Candidíases Invasivas	22
Antifúngicos e mecanismos de acção.....	23
Polienos	24
Inibidores da Síntese do Ergosterol.....	26
Inibidores da Síntese de Ácidos Nucleicos	28
Equinocandinas.....	29
Mecanismos de Resistência às Equinocandinas	30
Biofilmes: protecção vs resistência.....	32
Complexo Glucano-sintase como alvo das Equinocandinas.....	33
Biossíntese parede celular: mecanismo compensatório que confere resistência ..	34
Efeito Paradoxal	35
Mutações Hot Spot <i>FKS1</i> e resistência	37
Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos	38
Objectivo do Estudo	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
Seleção das Estirpes.....	42
Preparação de meios para cultura das estirpes.....	42
Teste de Susceptibilidade à Caspofungina.....	43
Preparação do Meio RPMI 1640.....	43
Preparação do Antifúngico	43
Método Diluição em Caldo, M27-A3	43
Análise do gene <i>FKS1</i>	44
Extracção DNA	44
Quantificação de DNA	44

Amplificação do gene <i>FKS1</i>	45
Electroforese em Gel de Agarose.....	46
Purificação dos Produtos de PCR	46
Sequenciação de DNA	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
Caracterização das Amostras	48
Teste de Susceptibilidade à Caspofungina.....	50
Análise do gene <i>FKS1</i>	55
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS	79
A. Ficha Técnica do Meio Sabouraud.....	80
B. Preparação Meio RPMI 1640 R6504	84
C. Esquema de Diluições Caspofungina-RPMI	87
D. Protocolo de Purificação de Produtos de PCR por Centrifugação	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Alvos das drogas antifúngicas correntes, em <i>Candida albicans</i>	24
Fig.2: Estrutura química da Anfotericina B	25
Fig.3: Estrutura química do Fluconazol e do Itraconazol	27
Fig.4: Estrutura química da Terbinafina	28
Fig.5: Estrutura química da Flucitosina	28
Fig.6: Estrutura química da Caspofungina, Micafungina e Anidulafungina	30
Fig.7: Estrutura da parede celular fúngica e modo de acção das equinocandinas	33
Fig.8: Demonstração, <i>in vitro</i> , dos efeitos paradoxal (A) e “trailling” (B)	36
Fig. 9: Representação gráfica da distribuição das Patologias de Base adjacentes a cada uma das 25 estirpes que constituem parte da amostra deste estudo	48
Fig. 10: Leitura e interpretação dos resultados do Teste de Susceptibilidade à Caspofungina pelo método de Microdiluição em Caldo, após 48 horas de incubação, das amostras YP0537 e YP0569	51
Fig. 11: Representação gráfica da distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas de Caspofungina (µg/ml) obtidas por leitura visual, às 48 horas de incubação, no Teste de Microdiluição em Caldo, para as 25 estirpes que constituíam a amostra deste estudo	53
Fig.12: Amplificação das regiões Hot Spot 1 (450pb) e Hot Spot 2 (497pb) da amostra 1; M: Marcador de Peso Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo	56
Fig.13: Amplificação das amostras 2, 3, 4 (duplicado), 5, 6 e 7 para a região Hot Spot 1 e das amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 para a região Hot Spot 2; M- Marcador de Peso Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo	57
Fig.14: Repetição das amostras 5 e 7 da região Hot Spot 2; M- Marcador de Peso	

Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo57

Fig. 15: Alinhamento de nucleótidos das amostras 1, 2, 3, 5, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região Hot Spot 160

Fig. 16: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 7, para a região Hot Spot 1 ..60

Fig. 17: Alinhamento de aminoácidos das amostras 1, 2, 3, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região Hot Spot 161

Fig. 18: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 2, para a região Hot Spot 1 ..62

Fig. 19: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 6, para a região Hot Spot 1 ..62

Fig. 20: Alinhamento de nucleótidos das amostras 2, 3, 5, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região Hot Spot 263

Fig. 21 Alinhamento de aminoácidos das amostras 2, 3, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região Hot Spot 264

Fig. 22: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 2, para a região Hot Spot 2 ..64

ÍNDICE DE TABELAS

Tab.1: Novos pontos de corte para as Equinocandinas e para cada espécie, propostos pelo Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI.....	39
Tab.2: <i>Primers</i> usados na reacção de amplificação das regiões Hot Spot 1 e Hot Spot 2 do gene <i>FKS1</i>	45
Tab.3: Caracterização das Amostras estudadas.....	49
Tab.4: Concentrações Inibitórias Mínimas das amostras estudadas, obtidas pelo método de Microdiluição em caldo	52

SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FC- Flucitosina
5-FU- 5-fluorouracil
A- Adenina
AND- Anidulafungina
C- Citosina
CI- Candidíases Invasivas
CIM- Concentração Inibitória Mínima
CHC- Centro Hospitalar de Coimbra
CSF- Caspofungina
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
G- Guanina
HOG- High Osmolarity Glycerol Response
HS1- Hot Spot 1
HS2- Hot Spot 2
HUC- Hospitais da Universidade de Coimbra
McF- MacFarland
MIC- Micafungina
NS- Não Susceptível
pb- Pares de bases
PCR- Polymerase Chain Reaction
PKC- Protein Kinase C
R- Resistente
RNA- Ácido Ribonucleico
S- Susceptível
SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
TAE- Tris-Acetato-EDTA
T- Timina
VIH- Vírus da Imunodeficiência Humana
YPD- Yeast Extract Peptone Dextrose

Os Fungos

Os Fungos são microrganismos eucariotas que ocorrem na Natureza de uma forma ubíqua (Kayser *et al.*, 2005). Estão entre os microrganismos mais importantes, não só pelo papel vital que desempenham nos ecossistemas, mas também pela influência que detêm a nível de variadas actividades humanas (Mueller *et al.*, 2004), quer a nível económico, quer a nível social. Várias espécies de fungos, especialmente leveduras, são essenciais a inúmeros processos de fermentação industrial, como produção de pão, álcool e queijos; muitos antibióticos, incluindo a penicilina, e imunossuppressores, como a ciclosporina, são fabricados a partir de fungos. Juntamente com bactérias, os fungos são responsáveis pela decomposição e reposição de matéria orgânica complexa (Hogg, 2005; Ferreira *et al.*, 1998). Para além das características atrás referidas, na actualidade, os fungos são uma importante ferramenta no estudo de processos biológicos essenciais, sendo usados regularmente na área da Citologia, Genética, Bioquímica, Biofísica e Microbiologia nas suas pesquisas; o fungo leveduriforme da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a célula eucariota sobre a qual se detém um maior conhecimento (Prescott *et al.*, 2002). As leveduras têm sido utilizadas com grande sucesso na produção de fármacos e vacinas, com recurso às modernas técnicas de Biotecnologia Molecular.

A nível taxonómico, os fungos são tradicionalmente classificados segundo a sua morfologia, estando, no entanto, esta classificação em fase de revisão, tendo em conta os resultados da aplicação de técnicas de sequenciação de ácidos nucleicos (Ferreira *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2007). Em Micologia Médica, normalmente são classificados, tendo em atenção aspectos práticos como os principais locais de infecção e características morfológicas. São classificados como dermatófitos, fungos leveduriformes, bolores (ou fungos filamentosos) e fungos dimórficos. Os bolores crescem como estruturas filamentosas, os fungos leveduriformes crescem como células únicas e os dermatófitos causam infecções dos tecidos queratinizados como a pele, cabelo e unhas (Kayser *et al.*, 2005).

Apenas cerca de duzentas espécies de fungos estão identificadas como sendo agentes de doença no Homem, sendo que, dentro destes, apenas alguns são responsáveis por mais de 90% de todas as infecções fúngicas em humanos. No entanto, recentemente, o aumento do número de pacientes com inúmeras condições que levam a um défice do sistema imune levou ao aparecimento de mais infecções fúngicas potencialmente mortais (Kayser *et al.*, 2005; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Os organismos pertencentes ao reino *Fungi* partilham várias características entre si que

os distingue de outros organismos, e que são importantes, nomeadamente, na medida em que permitem servir de alvos de variados agentes antifúngicos.

A nível da parede celular fúngica, esta consiste num esqueleto de fibras entrelaçadas sob uma matriz de material cristalino ou gelificado. Os principais componentes fibrosos são polissacarídeos como a quitina e glucanos. A quitina é um polímero linear, constituído por moléculas de N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas, extremamente resistente, que é também o principal constituinte do exoesqueleto de insectos e outros artrópodes. O glucano (α e β glucanos) é outro componente fibroso da parede celular dos fungos extremamente importante, excepto nas espécies do grupo dos Zygomycetes, sendo frequentemente o componente mais abundante. A rigidez da parede celular é da responsabilidade deste cruzamento de fibras de quitina e glucano. Um terceiro constituinte importante da parede celular dos fungos é o componente proteico. Estas proteínas estruturais surgem maioritariamente agregadas a oligossacáridos como a manose, pelo que são designadas de manoproteínas ou mananos (Webster *et al.*, 2007; Carlile *et al.*, 2001).

A parede celular dos fungos é vista, cada vez mais, como uma estrutura dinâmica e não como um revestimento inerte para a célula, podendo haver alteração da sua conformação em resposta a mudanças no ambiente que a rodeia (Carlile *et al.*, 2001).

Candida sp.

Candida é um género muito abrangente de Saccharomycetales anamórficos, pertencente ao Filo Ascomycota, que integra cerca de duzentas espécies (Webster *et al.*, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Warnock, 2007). São espécies cosmopolitas, podendo ser encontradas em variadas situações ecológicas, como na superfície de plantas e frutas, madeira em decomposição, no solo e água do mar, ou em associação com animais (Webster *et al.*, 2007).

São fungos dimórficos, podendo, por isso, apresentar-se quer na forma de levedura, quer na forma de hifas (Deacon, 2006).

As espécies de *Candida* são patogéneos oportunistas humanos relativamente comuns, sendo a mais comum *Candida albicans*. Outras espécies que ocasionalmente causam infecção são *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Podem ser encontradas nas mucosas da boca, tracto gastro-intestinal e tracto genito-urinário humanos (Palacio *et al.*, 2009) sem causar infecção, pelo que a maioria das

infecções são de origem endógena (Irving *et al.*, 2006).

Infecções Fúngicas por Espécies do Género *Candida*

As infecções graves causadas por espécies de *Candida* são maioritariamente oportunistas, ocorrendo em indivíduos imunocomprometidos e debilitados [ex.: em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)], sob antibioterapia de largo espectro, tratamentos imunossupressores ou com corticoesteróides e, especialmente, em pacientes em idades extremas (Irving *et al.*, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Enoch *et al.*, 2006).

Por este motivo as Candidíases Invasivas (CI) são consideradas como uma consequência dos avanços médicos e tecnológicos dos últimos anos, que levou a um aumento do número de indivíduos imunocomprometidos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Palacio *et al.*, 2009; Warnock, 2007) e as CI nosocomiais são uma preocupação crescente a nível do ambiente hospitalar (Ásmundsdóttir *et al.*, 2008). Englobam uma variedade de doenças graves que incluem candidémia, endocardite, meningite, endoftalmite e o envolvimento de diversos órgãos profundos (Palacio *et al.*, 2009).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais frequentemente encontrada em isolados clínicos, as espécies de *Candida* não-*albicans* revestem-se de especial importância, uma vez que algumas espécies são extremamente virulentas e estão associadas a uma maior probabilidade de falência da terapêutica devido a reduzida susceptibilidade aos agentes antifúngicos. Esta importância clínica crescente é relevante, por exemplo, em Unidades de Cuidados Intensivos e Centros de Transplantação (Enoch *et al.*, 2006; Irving *et al.*, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Para os indivíduos imunocompetentes, as infecções por espécies de *Candida* são na sua maioria superficiais, da pele ou mucosas. Pelo contrário, nos indivíduos imunocomprometidos, estas espécies oportunistas são bastante mais ameaçadoras, na medida em que facilmente se disseminam, causando doença sistémica potencialmente fatal (Singh *et al.*, 2009).

Num estudo de vigilância global (2001-2006) de espécies de *Candida* isoladas de sangue e de outros locais estéreis, 54% correspondiam a *C. albicans*, seguido por *C. parapsilosis* com 14%, *C. glabrata* igualmente com 14%, *C. tropicalis* com 12%, *C. krusei* com 3% e *Candida guilliermondii* a representar 1% (Pfaller *et al.*, 2008).

O diagnóstico clínico de CI é um desafio na medida em que a maioria dos sintomas apresentados são não-específicos, as manifestações clínicas podem ser semelhantes às de sépsis bacteriana e as culturas podem ser positivas apenas numa fase tardia do curso da infecção, sendo de realçar que a implementação de terapêutica antifúngica numa fase tardia da doença ou a ausência de tratamento são factores que potenciam a mortalidade em CI (Palacio *et al.*, 2009; Enoch *et al.*, 2006).

Patogénese de Candidíases Invasivas

As espécies de *Candida* podem entrar na corrente sanguínea por penetração directa após ruptura da barreira tecidular das mucosas, ou por disseminação a partir de biofilmes que se formam nos dispositivos médicos colocados nos doentes (cateteres, implantes dentários, próteses artificiais, etc.). A partir da corrente sanguínea as células fúngicas disseminam-se e infectam órgãos internos como os pulmões, rins, coração, cérebro e fígado, podendo causar fungémia e septicémia com sério comprometimento de vida (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Para a instalação de CI, em primeiro lugar, dá-se a adesão do fungo a uma superfície epitelial, através de adesinas; para causar infecção profunda, as células de *Candida* têm de penetrar as superfícies endoteliais e invadir os tecidos (Mishra *et al.*, 2007).

O aparecimento de candidíase tem por base a quebra de um delicado equilíbrio entre o *status* imunológico do hospedeiro e as características do patógeno oportunista (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2007), devendo-se não só à disfunção imunológica do hospedeiro mas também à capacidade de adaptação do fungo a novos nichos e aos factores de virulência a ele inerentes. Estes últimos incluem a secreção de enzimas hidrolíticas, variabilidade antigénica, adesão às células do hospedeiro ou a substratos inertes (ex: cateteres) através da produção de adesinas, dimorfismo (transição entre as formas de levedura e hifa), *switching* fenotípico (alterações morfológicas), capacidade de formação de biofilmes e modulação da resposta imune do hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2007; Palacio *et al.*, 2009). A expressão destes factores de virulência, *in vivo*, é dependente do estadio em que se encontra a infecção e do tipo de hospedeiro ou tecidos (Mishra *et al.*, 2007; Palacio *et al.*, 2009).

Antifúngicos e mecanismos de acção

Os Fungos, como referido anteriormente, são células eucariotas e, como tal, existe uma grande semelhança entre a estrutura celular e metabolismo das células fúngicas e das células humanas. Desta forma, os agentes antifúngicos podem interromper mecanismos metabólicos, tanto de células de fungos, como de células humanas (Sangamwar *et al.*, 2008; Kavanagh, 2005).

Teoricamente, os agentes antifúngicos devem apresentar uma toxicidade selectiva, de forma a poderem inibir o crescimento e reprodução do fungo sem, no entanto, afectar adversamente o hospedeiro. Assim, com base no mecanismo de acção e no grau de toxicidade para as células fúngicas alvo, os antifúngicos matam essas células - agente fungicida - ou inibem irreversivelmente o seu crescimento - agente fungistático (Kavanagh, 2005).

A partir dos anos 90, a resistência aos antifúngicos tornou-se um problema crescente, resultado do uso indiscriminado desses agentes, nomeadamente em pacientes imunodeprimidos, cujo tratamento profiláctico implicava uma terapêutica mais agressiva. O consequente aumento da incidência das infecções por fungos, exacerbou a necessidade de uma nova geração de agentes antifúngicos, visto que muitas das drogas então disponíveis revelavam efeitos adversos consideráveis, eram ineficazes contra muitos dos fungos emergentes ou levavam ao rápido desenvolvimento de resistências (Sangamwar *et al.*, 2008; Marie *et al.*, 2009). De facto, a resistência clínica tem sido observada em todas as classes de antifúngicos, sendo que nenhuma delas é efectiva contra todas as infecções fúngicas invasivas (Marie *et al.*, 2009).

Segundo Karkowska-Kuleta e colaboradores (2009), a maioria dos fungos patogénicos são susceptíveis aos agentes antifúngicos convencionais, mas o aumento da resistência a algumas dessas drogas é um novo e importante problema da medicina, especialmente a nível hospitalar.

Apesar do número de antifúngicos disponíveis ser significativamente menor que o número de antibacterianos, a procura de novas drogas antifúngicas, com toxicidade selectiva, nos últimos anos é incessante. De facto, durante a última década, houve um aumento dramático no número de novas drogas antifúngicas disponíveis para tratar infecções fúngicas invasivas (Johnson *et al.*, 2010).

Cada classe de drogas antifúngicas actua de modo particular e participa de um modo específico no tratamento contra os fungos. Assim, com base no seu mecanismo de acção, as drogas antifúngicas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos: os

polienos, os inibidores da síntese de ergosterol (onde se incluem os azóis e as alilaminas), os inibidores da síntese de ácidos nucleicos (5-flucitosina) e as equinocandinas (Marie *et al.*, 2009).

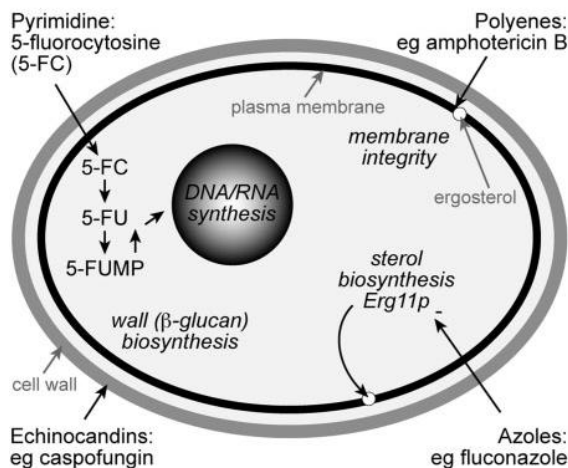


Fig. 1. Alvos das drogas antifúngicas correntes, em *Candida albicans* (Cannon, 2007).

Polienos

Os polienos são a classe de antifúngicos mais antiga, tendo, no entanto, grande importância a nível clínico devido ao seu espectro alargado e rara ocorrência de resistências (Marie *et al.*, 2009).

Têm como alvo de acção a membrana celular fúngica, actuando como disruptor das funções da mesma (Carlile *et al.*, 2001). Incluem a nistatina e a anfotericina B com as suas formulações lipídicas. Os polienos ligam-se a esteróis, em particular ao ergosterol, da membrana celular dos fungos e de células humanas, criando um modelo interactivo de poros formados por oito moléculas de anfotericina B ligadas hidrofobicamente ao ergosterol. Estes poros na membrana levam a uma alteração da permeabilidade da mesma, bem como à fuga de componentes citoplasmáticos, com consequente morte da célula fúngica (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006). Também se acredita que os polienos actuem causando danos oxidativos (Cannon *et al.*, 2007).

A anfotericina B convencional ou em formulação lipídica tem sido largamente utilizada para tratar variadas infecções por fungos leveduriformes, fungos filamentosos ou

criptococoses (Chen *et al.*, 2007), embora fungos como *Candida lusitanae* sejam naturalmente resistentes (Johnson *et al.*, 2010).

O uso de anfotericina B tem sido relacionado com o aparecimento de nefrotoxicidade e de reacções infusionais, podendo, no entanto, tais reacções serem minimizadas com a utilização das formulações lipídicas (Johnson *et al.*, 2010; Jabra-Rizk *et al.*, 2004; Enoch *et al.*, 2006).

A toxicidade da anfotericina B resulta na capacidade da droga se ligar ao colesterol das células humanas, embora com uma afinidade bastante mais reduzida comparativamente à sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica. No entanto, o seu uso é de interesse clínico devido ao facto de raramente serem encontradas estirpes resistentes (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Os polienos são activos contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Paracoccidioidomyces*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e têm actividade fungicida contra a maioria parte dos fungos leveduriformes e filamentosos. Por possuírem colesterol ao invés de ergosterol na sua parede celular, espécies de *Pneumocystis* são naturalmente resistentes. Devido ao seu espectro alargado de acção, os polienos são normalmente utilizados no tratamento empírico (Marie *et al.*, 2009).

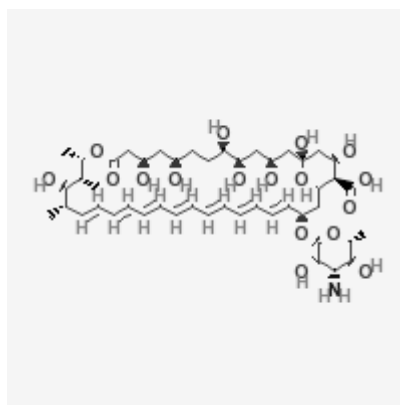


Fig.2: Estrutura química da Anfotericina B (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365&loc=ec_rcs)

Inibidores da Síntese do Ergosterol

Azóis

Esta classe de antifúngicos é a mais largamente usada na prática clínica (Chen *et al.*, 2007; Marie *et al.*, 2009). Têm como alvo a síntese do ergosterol da membrana celular dos fungos, pois actuam inibindo a enzima lanosterol 14 α -demetilase, que faz parte do complexo citocromo p450 e é essencial à biossíntese do ergosterol (Marie *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). Esta inibição resulta na acumulação de produtos intermediários do esterol, com consequente dano na biorregulação da fluidez, simetria e integridade da membrana, pela depleção do ergosterol da membrana (Jabra-Rizk *et al.*, 2004) o que leva a uma inibição do crescimento da célula fúngica (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Uma vez que as enzimas do complexo citocromo p450 envolvidas neste processo são as responsáveis pela síntese de colesterol nas células humanas, a biossíntese deste é comprometida e representa a base dos efeitos adversos desta classe (Marie *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001).

Na prática clínica, distinguem-se dois grupos: Imidazóis e Triazóis. O primeiro inclui o ketoconazol, miconazol e clotrimazol, sendo frequentemente usados no tratamento de infecções fúngicas superficiais, apresentando, no entanto, limitações no tratamento de micoses invasivas (Chen *et al.*, 2007; Marie *et al.*, 2009). O segundo inclui triazóis de primeira geração e triazóis de segunda geração. Os triazóis de primeira geração englobam drogas como fluconazol e itraconazol e são utilizadas no tratamento de infecções fúngicas superficiais e invasivas; de um modo geral, o fluconazol tem boa actividade sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto mostra baixa actividade contra *C. krusei* e alguns isolados de *C. glabrata*. O fluconazol é relativamente bem tolerado e apresenta baixa incidência de efeitos adversos, sendo o agente mais activo no tratamento de candidíase vaginal e de candidíase orofaríngea (em pacientes infectados com o VIH), bem como na profilaxia em pacientes neutropénicos após transplante de medula óssea (Jabra-Rizk *et al.*, 2004).

O aparecimento dos triazóis de segunda geração, que incluem voriconazol e posaconazol, veio aumentar o espectro de acção deste grupo de drogas, apresentando boa actividade contra a maioria dos fungos, incluindo *C. neoformans*, *Aspergillus*, *Scedosporium* e espécies de *Fusarium* (Marie *et al.*, 2009). O voriconazol apresenta actividade contra espécies de *Candida*, tendo sido, no entanto, observada resistência

cruzada; o posaconazol representa um maior espectro de acção (Chen *et al.*, 2007).

A acção dos azóis é maioritariamente fungistática, inibindo o crescimento dos fungos, ao invés de provocar a sua morte e, apesar de serem menos desejáveis que as drogas fungicidas, podem ser de grande valor terapêutico (Carlile *et al.*, 2001).

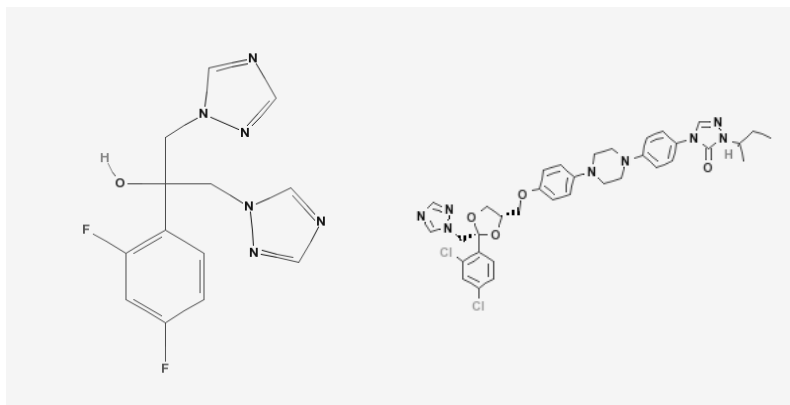


Fig.3: Estrutura química do Fluconazol e do Itraconazol, respectivamente (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365 &loc=ec_rcs)

Alilaminas

Esta classe de antifúngicos, que inclui a Terbinafina, faz parte das drogas que afectam a biossíntese do ergosterol e é normalmente utilizada no tratamento tópico de infecções por dermatófitos e infecções cutâneas por *Candida* (Carlile *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007). A Terbinafina actua através da inibição da enzima esqualeno epoxidase, resultando numa concentração anormalmente elevada de esqualeno. A acumulação deste composto cria uma permeabilidade membranar excessiva, conduzindo à morte celular (Espinell-Ingroff, 2008).

Apesar de esta droga ser geralmente reservada para o tratamento de infecções causadas por dermatófitos, demonstrou elevado potencial sinérgico quando usado em combinação com outros antifúngicos, como fluconazol ou voriconazol, contra *Candida sp.*, em vários estudos *in vitro* (Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001).

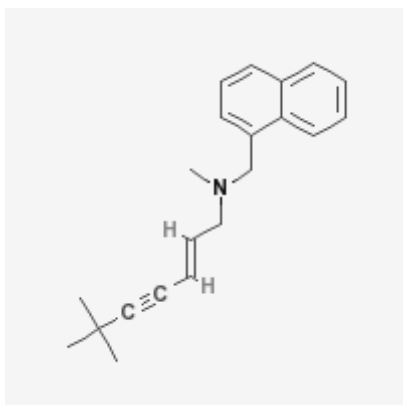


Fig.4: Estrutura química da Terbinafina (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365&loc=ec_rcs)

Inibidores da Síntese de Ácidos Nucleicos

Flucitosina (5-FC)

A Flucitosina é uma droga sintética análoga dos nucleótidos piramidínicos, cuja acção tem por base a síntese de RNA (Ácido Ribonucleico) aberrante, interferindo com a replicação de DNA (Ácido Desoxiribonucleico) e síntese proteica (Espineli-Ingroff, 2008; Cannon *et al.*, 2007).

Depois de ser transportado para dentro da célula fúngica pela citosina permease, a 5-FC é convertida em 5-fluorouracil (5-FU), pela enzima citosina desaminase, e depois em 5-fluorodesoxiuridilato, após uma série de passos enzimáticos. Este último inibe a acção da timidilato sintase, que é uma enzima chave na síntese de timidina e, como tal, na síntese de DNA (Carlile *et al.*, 2001). O 5-FU também pode ser metabolizado a ácido 5-fluorouridílico, que é depois incorporado no RNA (Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001).

Uma vez que as células humanas não possuem a enzima citosina desaminase, a conversão de 5-FC em 5-FU dá-se apenas nas células fúngicas, pelo que esta droga apresenta muito poucos efeitos adversos (Carlile *et al.*, 2001).

No entanto o número de isolados de *C. albicans* resistentes à 5-FC assumiu proporções significativas, limitando muito a sua utilização como agente único (Cannon *et al.*, 2007),

sendo, por isso, um antifúngico largamente utilizado em combinação com outros antifúngicos, como é o caso da sua combinação com anfotericina B, no tratamento de candidíases invasivas (Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001). Apresenta actividade contra *Candida sp.*, *Cryptococcus* e alguns fungos filamentosos (Enoch *et al.*, 2006).

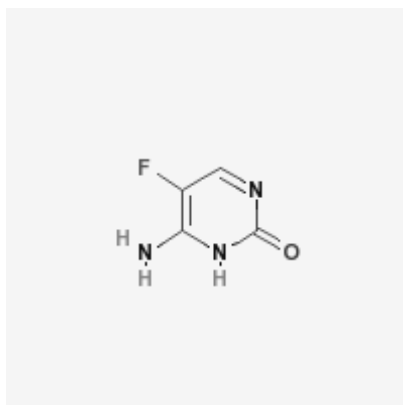


Fig.5: Estrutura química da Flucitosina (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365&loc=ec_rcs)

Equinocandinas

As Equinocandinas são a mais recente classe de antifúngicos desenvolvidos (Cannon *et al.*, 2007; Grover, 2010). Originalmente, foram obtidas a partir de fungos do solo, tendo sido depois desenvolvidos os derivados semi-sintéticos como a Caspofungina (CSF), Micafungina (MIC) e Anidulafungina (AND) (Cannon *et al.*, 2007).

Representam a primeira classe de antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas invasivas a entrar na rotina clínica que têm como alvo a parede celular dos fungos (Johnson *et al.*, 2010; Carlile *et al.*, 2001).

Estruturalmente, são hexapeptídeos cíclicos modificados com cadeias laterais de lípidos essenciais à actividade fúngica (Walker *et al.*, 2010), cujo principal alvo é a proteína Fks1, a subunidade catalítica do complexo $\beta(1,3)$ – glucano sintase, que está presente nas células de fungos mas não nas células humanas. Esta representa a enzima chave na síntese do $\beta(1,3)$ – glucano da parede celular dos fungos, pelo que a inibição da sua actividade interfere com a biossíntese da mesma, produzindo uma instabilidade osmótica, com consequente morte celular (Grover, 2010; Espinel-Ingroff, 2008). A ligação das equinocandinas à enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase é feita de um modo não competitivo e

não existem ainda provas formais de que a proteína Fks1 representa a subunidade catalítica do $\beta(1,3)$ – glucano (Walker *et al.*, 2010).

As equinocandinas têm actividade contra uma variedade de fungos patogêneos para os humanos, sendo fungicidas contra espécies de *Candida* como *C. albicans* e *C. guilliermondii* (Munro, 2010). São recomendadas como terapia de primeira linha no tratamento de candidêmias em pacientes neutropênicos e não neutropênicos e como terapia de primeira ou segunda linha no tratamento de variadas infecções fúngicas (Cappelletty *et al.*, 2009). Demonstram também boa actividade contra estirpes de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol ou anfotericina B. Pelo contrário, contra espécies de *Aspergillus* demonstram apenas actividade fungistática (Grover, 2010).

De um modo geral, estas drogas apresentam um excelente perfil de biossegurança e tolerabilidade, sendo raros os casos de efeitos adversos relacionados com a sua administração (Perlin, 2007). O principal efeito secundário é hepatotoxicidade, com alteração do nível sérico das transaminases; também apresentam maior segurança em casos de insuficiência renal do que a Anfotericina B (Grover, 2010).

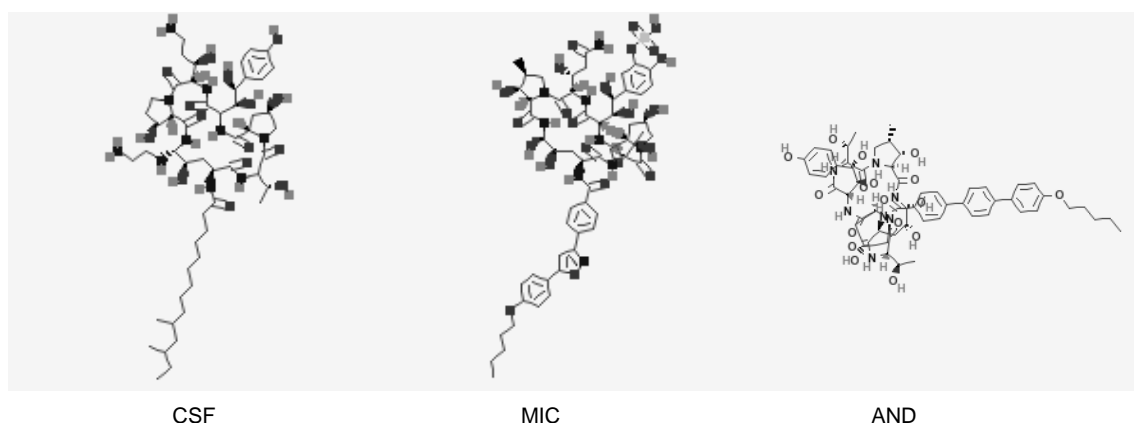


Fig.6: Estrutura química da CSF, MIC e AND (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365&loc=ec_rcs)

Mecanismos de Resistência às Equinocandinas

A resistência aos antimicrobianos representa um fenómeno biológico de extrema importância, com impacto considerável na saúde humana, pelo que, a resistência às drogas antifúngicas não representa uma excepção.

A exposição a estes agentes, em *C. albicans*, é um factor importante de stress ambiental, o que leva à estimulação de respostas a nível celular, que visam eliminar ou minimizar os efeitos nefastos desses agentes, nomeadamente através indução da regulação positiva de alvos desses agentes e genes já identificados como importantes para a aquisição de resistências (Cannon *et al.*, 2007).

A resistência dos microrganismos às drogas administradas pode ser primária ou secundária. A primeira refere-se àquela encontrada em certas estirpes de fungos sem que tenha havido uma exposição prévia ao agente antifúngico. Um exemplo é a resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol. A resistência secundária é aquela que se desenvolve em estirpes previamente susceptíveis, após exposição ao agente antifúngico. O termo resistência clínica é aplicado quando a erradicação da infecção fúngica não ocorre, apesar da administração de um agente antifúngico com actividade *in vitro* contra o microrganismo, e esta pode dever-se a uma combinação de factores que envolvem o hospedeiro, o agente patogénico e o agente antifúngico (Kanafani *et al.*, 2011)

Apesar de ser extremamente rara até aos anos 90, a resistência às drogas antifúngicas tem vindo, rapidamente, a tornar-se um problema crescente, especialmente em determinadas populações, como é o caso dos pacientes infectados com VIH (Sangamwar *et al.*, 2008).

A resistência à equinocandina CSF em espécies de *Candida* é relativamente incomum, estando no entanto publicados inúmeros casos clínicos de infecções por espécies de *Candida* em que os isolados demonstram CIM de CSF elevadas, estando algumas associadas a falência nos tratamentos (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008a).

Como em qualquer classe de drogas antifúngicas, o aparecimento de casos de resistência clínica representa um problema de importantes dimensões, especialmente devido ao uso crescente destes novos agentes (Laverdière *et al.*, 2006) e, à medida que a exposição dos doentes a estes novos agentes aumenta, é expectável que aumente também o número de casos de infecções por estirpes com susceptibilidade reduzida aos mesmos (Perlin, 2007; Balashov *et al.*, 2006).

Sendo as equinocandinas a mais recente classe de antifúngicos a entrar no mercado em décadas, é essencial que se conheçam e compreendam os mecanismos de resistência e como estes se desenvolvem (Balashov *et al.*, 2006).

Biofilmes: protecção vs resistência

Os biofilmes são caracterizados como uma comunidade de microrganismos organizados entre si, que assenta numa matriz extracelular, e representam o tipo de crescimento fúngico mais comum (Trofa *et al.*, 2008; Marie *et al.*, 2009). São estruturas universais e complexas associadas a superfícies, sejam elas tecidos ou dispositivos médicos, como cateteres venosos periféricos ou centrais, de diálise peritoneal, válvulas cardíacas, etc. (Ferreira *et al.*, 2009), que se convertem em focos de disseminação da infecção e limitam as funções próprias destes dispositivos.

A formação de biofilmes é reconhecida como um potente factor de virulência de variadas espécies de *Candida*, estando intimamente relacionada com a resistência destas estirpes à terapia antifúngica (Trofa *et al.*, 2008). À medida que biofilme vai sendo formado, gera-se uma barreira física que limita a penetração de substâncias através da matriz, protegendo as células subjacentes. Por outro lado, a matriz liga-se às drogas antifúngicas, diminuindo, assim, a concentração disponível das mesmas. Outra função desta barreira é proteger as células fúngicas do sistema imunológico do hospedeiro (Walker *et al.*, 2010; Trofa *et al.*, 2008).

Os biofilmes de *C. albicans* apresentam resistência intrínseca contra a maioria dos agentes antifúngicos (Espinell-Ingroff, 2009) e são notoriamente difíceis de eliminar, sendo a fonte de numerosas infecções sistémicas com difícil tratamento. Indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles que possuem dispositivos médicos, são os mais susceptíveis (Jabra-Rizk *et al.*, 2004). De facto, o tratamento antifúngico que não seja associado à remoção de tais dispositivos, raramente surte efeitos positivos, pelo que a sua remoção é essencial ao sucesso do tratamento (Vediyappan *et al.*, 2010).

As bases moleculares da resistência aos antifúngicos relacionada com a formação de biofilmes não estão, de todo, compreendidas e os mecanismos de resistência exibidos pelos biofilmes de espécies de *Candida* são ainda desconhecidos (Ferreira *et al.*, 2009).

Apesar da matriz extracelular não estar, ainda, completamente caracterizada, sabe-se que um dos componentes mais importantes é o $\beta(1,3)$ – glucano, o que pode explicar o facto de as equinocandinas terem mostrado boa actividade contra os biofilmes (Walker *et al.*, 2010).

Complexo Glucano-sintase como alvo das Equinocandinas

A enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase consiste num complexo heteromérico, constituído por várias subunidades, que é essencial à construção da parede celular fúngica. Esta enzima é responsável pela síntese das fibras de $\beta(1,3)$ – glucano, o polissacarídeo estrutural mais importante da estrutura da parede celular e que, em conjunto com a quitina, conferem estrutura e rigidez à mesma (Carlile *et al.*, 2001; Munro, 2010). A inibição da síntese deste polissacarídeo por parte das células fúngicas leva à impossibilidade destas manterem a forma e rigidez necessárias para resistir à pressão osmótica, o que, em última análise, culmina na lise celular (Chandrasekar *et al.*, 2006).

Da sua constituição fazem parte, pelo menos duas subunidades. A primeira é uma proteína integral da membrana, Fks1, de grandes dimensões, com actividade catalítica e que se liga a moléculas de glicose-UDP provenientes do citoplasma. Esta proteína é codificada por um ou mais genes, dependendo da espécie em questão (Desnos-Ollivier *et al.*, 2008b). A segunda consiste numa pequena GTPase da superfamília Ras, a proteína Rho, que funciona como subunidade reguladora do complexo glucano-sintase (Liu *et al.*, 2001; Munro, 2010; Dismukes *et al.*, 2003). Tem também uma função reguladora da actividade da proteína quinase C (PKC), que desempenha um papel crucial na cascata de transdução de sinal, nomeadamente na regulação da transcrição de genes implicados na biossíntese da parede celular e nas respostas de stress (Carlile *et al.*, 2001).

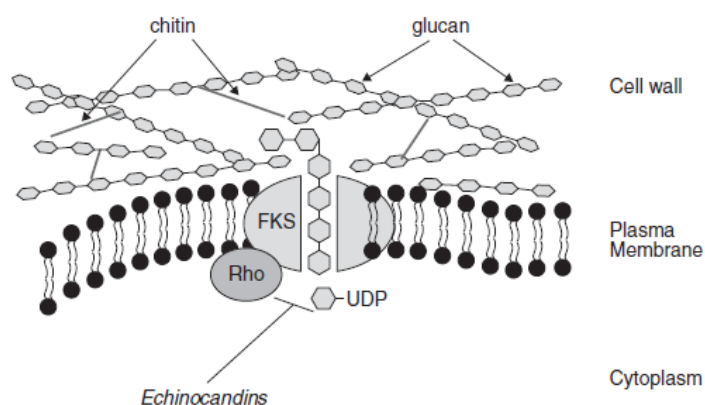


Fig.7: Estrutura da parede celular fúngica e modo de acção das equinocandinas (Dismukes *et al.*, 2003)

Estudos bioquímicos têm mostrado que componentes associados à membrana, como o Pma1, estão igualmente interligados com o complexo glucano-sintase, através da

manutenção do gradiente de prótons através da membrana. No entanto, a natureza mecânica da interacção entre as equinocandinas e o complexo glucano-sintase é, ainda, bastante ambígua (Perlin, 2007).

Biossíntese da parede celular: mecanismo compensatório que confere resistência

Estudos que focam mecanismos de resistência às equinocandinas sugerem que a sensibilidade das estirpes de *Candida* está relacionada, não apenas com a afinidade da proteína alvo Fks1 pelas equinocandinas, mas também com aspectos relacionados com a fisiologia da célula fúngica (Walker *et al.*, 2008).

De facto, a parede celular dos fungos apresenta-se como uma estrutura dinâmica, em que a inibição da síntese de um dos seus componentes resulta num mecanismo compensatório que tem por fim a elevação da concentração de outros componentes. A depleção de $\beta(1,3)$ – glucano da parede celular, como consequência da acção das equinocandinas, leva a um aumento da síntese de chitina (Walker *et al.*, 2010), sendo que, a activação da síntese de chitina é mediada pelas vias de sinalização intracelular PKC, Ca^{2+} - calcineurina e HOG (high osmolarity glycerol response) (Munro *et al.*, 2007).

Danos na parede celular fúngica são detectados por proteínas transmembranares, que funcionam como sensores, e que enviam um sinal intracelular que leva à activação da Rho GTPase, que tem como um dos alvos finais a PKC (Munro *et al.*, 2007). A HOG faz parte da família das MAP (mitogen-activated protein) kinases e está envolvida na resposta adaptativa ao stress oxidativo e pressão osmótica em *C. albicans* e na regulação da arquitectura da parede celular (Eisman *et al.*, 2006). A via de sinalização do Ca^{2+} (via calcineurina) desempenha um papel fundamental na regulação da síntese de chitina, uma vez que é responsável pela activação de sintases da chitina e, pela regulação de genes que levam à síntese de proteínas da parede celular fúngica e da subunidade catalítica da sintase do glucano, Fks1 (Munro *et al.*, 2007).

Plaine e colaboradores (2008) demonstraram, com os seus resultados, que estirpes mutantes de *C. albicans* com elevada concentração de chitina na sua parede celular apresentavam susceptibilidade reduzida à CSF.

Num estudo de Walker e colaboradores (2008), observou-se que, em presença de elevadas concentrações de CSF, as células de *C. albicans* formavam colónias resistentes e que estas apresentavam um conteúdo em chitina significativamente mais elevado que

as células de *C. albicans* do tipo selvagem.

O bloqueio da via da calcineurina, quer pela ruptura dos genes envolvidos nessa via, quer pela utilização de inibidores da calcineurina, gera uma acção sinérgica com a CSF em isolados de *C. albicans* (Walker *et al.*, 2008).

Estes achados parecem evidenciar um mecanismo de tolerância às equinocandinas por parte dos fungos, sugerindo que estes possuem uma habilidade natural para se adaptarem aos tratamentos com CSF, através de um mecanismo compensatório de aumento de chitina na parede celular.

Este efeito compensatório evidencia a necessidade de elaboração de novas estratégias de tratamento contra as infecções fúngicas, nomeadamente na utilização de uma terapêutica combinada entre inibidores da síntese da chitina e equinocandinas, criando um efeito sinérgico e alargando o espectro de acção destas últimas. Esta combinação terapêutica será particularmente benéfica nos casos de infecções por fungos com resistência intrínseca às equinocandinas (Walker *et al.*, 2010).

Efeito Paradoxal

O termo efeito paradoxal refere-se à ocorrência de crescimento de fungos susceptíveis às equinocandinas em presença de elevadas concentrações destas, excedendo em muito o valor das CIM em testes de microdiluição, realizados segundo as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Perlin, 2007; Melo *et al.*, 2007).

Este fenómeno é similar ao efeito “Eagle”, que foi descrito pela primeira vez em 1948 por Eagle para a penicilina (Cantón *et al.*, 2007), no qual acima de uma determinada concentração de droga, em vez de uma diminuição, se observa um ressurgimento do crescimento e depois de sucessivas concentrações sem crescimento (Melo *et al.*, 2007; Cappelletty *et al.*, 2009), e corresponde a uma perda de actividade dessa droga contra a estirpe em questão.

Em *C. albicans*, os primeiros relatos deste fenómeno datam de 2004, por Stevens e colaboradores, em que observaram crescimento de alguns isolados quando expostos a elevadas concentrações de CSF, apesar de exibirem um padrão de susceptibilidade normal com concentrações baixas. No entanto, a importância deste efeito paradoxal, *in vivo*, ainda permanece pouco clara (Perlin, 2007). Paralelamente ao “efeito paradoxal”, a utilização de elevadas concentrações de antifúngicos pode também resultar num efeito

“trailing”, em que há um crescimento reduzido mas persistente. Este efeito só foi detectado *in vitro*, em *Candida sp.*, quando cultivada em meio contendo azóis (Fleischhacker *et al.*, 2008).

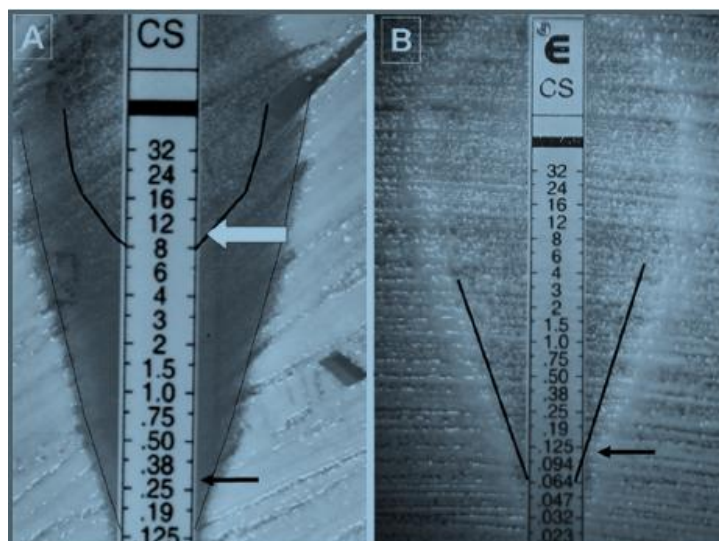


Fig.8: Demonstração, *in vitro*, dos efeitos paradoxal (A) e “trailing” (B) (Khelif *et al.*, 2010)

Estes fenómenos podem ser detectados visualmente, podendo mesmo, em alguns isolados, serem observados em simultâneo (Cantón *et al.*, 2007).

Os mecanismos moleculares adjacentes à ocorrência do efeito paradoxal têm sido elucidados nos últimos tempos. Foi demonstrado um aumento da síntese e do conteúdo de quitina como mecanismo compensatório pela perda de $\beta(1,3)$ – glucano e $\beta(1,6)$ – glucano, após exposição à CSF (Khelif *et al.*, 2010; Chamilos *et al.*, 2007; Perlin, 2007). Além do mais, foram implicadas vias de transdução de sinal na regulação do efeito paradoxal, como a via da PKC (Fortwendel *et al.*, 2010) e a via do Ca^{2+} - calcineurina, esta última através da regulação da biossíntese da parede celular (Walker *et al.*, 2008). Sabe-se também que este fenómeno não está relacionado com mutações pontuais nem com alteração da sensibilidade das equinocandinas pelo complexo glucano-sintase (Perlin, 2007).

Os estudos efectuados evidenciam que a observação do efeito paradoxal é mais comum com a CSF que com as outras equinocandinas (Fleischhacker *et al.*, 2008), pelo que o uso de ANF pode ser bastante eficaz no tratamento de biofilmes associados ao uso de catéteres (Pemán *et al.*, 2008).

Mutações Hot Spot FKS1 e resistência

Estudos genéticos efectuados por Cameron Douglas em 1997 (Douglas *et al.*, 1997) davam conta que a subunidade Fks1 do complexo glucano sintase seria, provavelmente, o alvo de acção das drogas da classe das equinocandinas e que alterações estruturais a nível desse alvo resultariam numa susceptibilidade reduzida às mesmas (Perlin, 2007).

Apesar de estudos de vigilância concluírem que não há evidências de tendência para o aparecimento de isolados clínicos de espécies de *Candida* resistentes às equinocandinas, a verdade é que se multiplicam os relatos de falência terapêutica com estas drogas (Pfaller *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2010).

As estirpes de *C. albicans* que apresentaram elevados valores de CIM de CSF, foram estudadas e revelaram mutações a nível do gene *FKS1*, que codifica a proteína Fks1, em que foram observadas substituições de aminoácidos entre as posições 641-649, numa região designada por “Hot Spot 1” (HS1), e entre as posições 1345-1365, numa outra região denominada de “Hot Spot 2” (HS2) (Walker *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2005; Balashov *et al.*, 2006). A evidência mais sugestiva de que as modificações a nível da subunidade Fks1 são o mais importante mecanismo de resistência a drogas que visam esta proteína, é a observação, a nível bioquímico, de um decréscimo significativo na sensibilidade dessas drogas à enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase, devido às mutações pontuais características já referidas. De facto, a alteração do aminoácido serina na posição 645 demonstra um efeito inibitório tremendo sobre a $\beta(1,3)$ – glucano sintase (Perlin, 2007). Estudos foram efectuados em torno das propriedades cinéticas da enzima em questão em estirpes com sensibilidade reduzida à CSF, tendo sido observado que a sensibilidade da enzima para a mesma estava bastante diminuída, correspondendo a um aumento do K_i (constante de inibição), que varia consoante a mutação. Descobriu-se também que, em estirpes que evidenciavam tais mutações, havia uma relação entre o aumento do K_i da enzima mutada e o aumento dos valores de CIM, embora essa relação não seja linear (Garcia-Effron *et al.*, 2009a).

As mutações do gene que codifica a proteína Fks1 apresentam-se como um mecanismo universal de resistência, uma vez que se estende a outras espécies de *Candida* que não *C. albicans*, como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Candida dubliniensis*.

Mutações a nível do HS1 e que conferem resistência foram identificadas em diversos isolados clínicos de *C. albicans*, bem como de *C. krusei* e *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Katiyar *et al.*, 2006; Laverdière *et al.*, 2006; Kahn *et al.*, 2007; Garcia-Effron *et al.*, 2008).

Mutações do HS2 foram identificadas, por Park e colaboradores (2005) numa estirpe de *C. kruzei*, isolada de um paciente refractário à terapêutica e, numa estirpe de *C. albicans* pelo grupo de Laverdière (2006).

Em *C. albicans* estas mutações apresentam-se como dominantes, conferindo resistência quer em presença de alelos homozigóticos, quer em presença de alelos heterozigóticos, e para qualquer uma das equinocandinas (Walker *et al.*, 2010).

Apesar de as evidências sugerirem que a subunidade Fks1 desempenha um papel crucial durante o crescimento vegetativo e que representa o principal alvo das drogas da classe das equinocandinas, estudos recentes revelam novas mutações “*Hot Spot*”, a nível da subunidade Fks2, em *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*, e que resultaram em elevados valores de CIM para as equinocandinas. Em *C. glabrata*, o gene FKS2 parece ter um nível de expressão superior ao gene *FKS1* (Garcia-Effron *et al.*, 2009b).

Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos

Com o crescente relato de falhas terapêuticas e o aparecimento de estirpes resistentes às equinocandinas, é também crescente a necessidade de aplicação de testes de susceptibilidade *in vitro*, bem como o uso de métodos moleculares que permitam, não só a detecção de estirpes de *Candida* potencialmente resistentes, mas também a caracterização de mecanismos de resistência às drogas desta classe (Arendrup, 2010; Garcia-Effron, 2009c).

Testes de referência padronizados para fungos leveduriformes têm sido publicados, tanto pelo CLSI como pelo EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing), de forma a poderem comparar-se os dados clínicos de susceptibilidades (Kafani, 2008).

O Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI determinava, no último documento publicado em 2008, M27-A3, um ponto de corte interpretativo para as equinocandinas de 2 µg/ml, considerando Susceptível (S) se CIM ≤ 2 µg/ml e Não Susceptível se CIM > 2 µg/ml, e para todas as espécies de *Candida*. No entanto, estudos recentes, que têm em consideração aspectos como mecanismos de resistência, epidemiologia da distribuição dos valores de CIM, estudos cinéticos da enzima β(1,3) – glucano sintase e parâmetros associados com sucesso em modelos farmacodinâmicos, mostram que o ponto de corte de S ≤ 2 µg/ml será excessivamente elevado (Arendrup, 2010). Na verdade, tal como foi sugerido por Garcia-Effron e colaboradores (2009b; 2009c), o ponto de corte deverá ser

reduzido até 0,25 µg/ml, assegurando a correcta distinção entre estirpes *wild type* (WT) e estirpes que possuem mutações *FKS1/FKS2* (Wiederhold, 2008). Assim sendo, o Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI estabeleceu novos pontos de corte para cada uma das equinocandinas e específicas para cada espécie (Pfaller, 2011), como apresentado na tabela 1.

Tab.1: Novos pontos de corte para as Equinocandinas e para cada espécie, propostos pelo Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI (Pfaller *et al.*, 2011).

Espécie	CIM de Susceptibilidade/ CIM de Resistência		
	Caspofungina	Anidulafungina	Micafungina
<i>Candida albicans</i>			
<i>Candida dubliniensis</i>			
<i>Candida tropicalis</i>	≤0,25/≥1	≤0,25/≥1	≤0,25/≥1
<i>Candida krusei</i>			
<i>Candida glabrata</i>	≤0,125/≥0,5	≤0,125/≥0,5	≤0,06/≥0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	≤2/≥8	≤2/≥8	≤2/≥8
<i>Candida guilliermondii</i>			
<i>Candida lusitanae</i>	≤2/≥8	≤0,5/≥2	≤0,5/≥2

Embora a maioria dos estudos de susceptibilidade de espécies de *Candida* às equinocandinas sejam realizados usando métodos de referência para testes de diluição em caldo, macro ou microdiluição, métodos alternativos têm sido testados na rotina de Laboratórios de Microbiologia Clínica, como é o caso de testes de difusão em agar, em disco ou Etest® (Desnos-Ollivier, 2008a).

Objectivo do Estudo

O presente estudo tem como objectivo a avaliação do perfil de susceptibilidade de um grupo de isolados clínicos de *C. albicans*, à equinocandina CSF, pelo método de referência de microdiluição em caldo, de acordo com as *guidelines* do documento M27-A3 do CLSI. A pesquisa de mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1* vai ser

efectuada nas estirpes resistentes ou com reduzida sensibilidade ao antifúngico, de forma a relacionar a presença ou ausência de mutação com a diminuição da sensibilidade ao fármaco.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleccção das Estirpes

O grupo de 25 estirpes de *C. albicans* testadas neste estudo insere-se numa colecção de Fungos pertencente à Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, isoladas a partir de produtos biológicos de origem profunda (sangue, líquido pleural, líquido peritoneal, etc.), nos Laboratórios de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC) e dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), entre os anos de 2005 e 2011.

Preparação de meios para cultura das estirpes

Sabouraud

O meio de Sabouraud (Biomérieux®) foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante, distribuído em placas de Petri esterilizadas e conservado à temperatura de 2-8 °C (Ver Anexo A).

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

Pesaram-se 20 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levedura e 20 g de agar e dissolveu-se em 1000 ml de água destilada. Autoclavou-se a 121°C por 15 minutos, distribuiu-se cerca de 25 ml de meio em placas de Petri esterilizadas, que foram depois conservadas a 2-8°C.

Teste de Susceptibilidade à Caspofungina

Preparação meio RPMI 1640

Preparou-se o meio RPMI 1640 R6504 (Sigma-Aldrich®) de acordo com as instruções do fabricante (Ver Anexo B).

Preparação do Antifúngico

Foi preparada, em água, uma solução padrão de CSF (Acetato de Caspofungina-CANCIDAS, Merck & Co., Inc.) de concentração 512 µg/ml.

Método de Diluição em Caldo M27-A3

A avaliação da susceptibilidade à CSF foi executada tendo por base o documento M27-A3 da CLSI (CLSI, 2008).

Foram preparadas 12 soluções de CSF no meio do teste, RPMI 1640, com concentrações entre 64 a 0,015625 µg/ml, e distribuídas em placas *multiwell* de 96 poços, de acordo com o esquema de diluições em Anexo (Ver Anexo C).

Para a obtenção do inóculo, e para cada uma das estirpes, foi preparada uma solução stock com densidade 0,5 na escala de MacFarland (McF) a partir de culturas de *C. albicans* cultivadas em Sabouraud, incubadas 18-24 horas a 35°C.

A suspensão resultante foi colocada num agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade foi novamente ajustada a 0,5 McF.

De seguida preparou-se uma diluição dessa suspensão a 1:50 em água destilada esterilizada, diluindo-se novamente a 1:20 no meio do teste obtendo-se assim um inóculo 2 vezes concentrado (1×10^3 a 5×10^3 UFC/ml).

Colocou-se 100 µl desta última suspensão em cada um dos poços da placa *multiwell*, excepto no poço do controlo de esterilidade (4D e 4H), resultando num inóculo com $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml e concentrações de CSF entre 32 e 0,0078125 µg/ml. Os

poços 1D, 2D, 3D, 1H, 2H e 3H representam os controlos de crescimento, em triplicado para cada estirpe testada (Anexo C).

Incubaram-se as placas *multiwell* a 35°C e foram feitas leituras dos resultados, visualmente, às 24 e às 48 horas.

Análise do gene *FKS1*

Extracção de DNA

A extracção de DNA total das estirpes seleccionadas foi efectuada pelo método do isopropanol. Para tal preparou-se uma suspensão de cada uma das estirpes, cultivadas em meio YPD a 35°C durante 24-48 horas, em tubos de eppendorf com 500 µl de solução de sorbitol 0.9 M, 0,1 M EDTA. A esta adicionou-se 30 µl de solução de Zimolase 1 mg/ml. Agitou-se no vórtex durante 1 minuto e incubou-se a 37°C durante 1 hora, repetindo regularmente o vórtex. De seguida, centrifugou-se 5 minutos a 12000 rpm. Após retirar o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 500 µl de uma solução de 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA. Adicionou-se à mistura 13 µl de solução SDS a 10% e agitou-se no vórtex durante 1 minuto. Após uma incubação a 65°C durante 5 minutos, adicionou-se 200 µl de acetato de potássio 5 M e colocaram-se os tubos no gelo durante 10 minutos. Numa centrífuga refrigerada a 4°C, centrifugaram-se os tubos a 12000 rpm, durante 15 minutos. Ao sobrenadante resultante foi adicionado um volume de isopropanol frio, agitando suavemente. Deixaram-se os tubos à temperatura ambiente, durante 10 minutos, após os quais se realizou nova centrifugação a 12000 rpm, durante 15 minutos. Lavou-se o sedimento com etanol a 70% e ressuspendeu-se, após centrifugação, em cerca de 20 µl de água estéril. Os extraídos foram guardados a -20°C.

Quantificação de DNA

A quantificação de DNA e verificação da sua pureza foi feita no Biofotómetro Eppendorf®.

Amplificação do gene *FKS1*

Para pesquisar mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*, as sequências pretendidas foram amplificadas através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). A mistura de PCR foi constituída por 5 µl Tampão (Finnzyme, Thermo Scientific), 1,5 µl de MgCl₂ (Finnzyme, Thermo Scientific), 4 µl de nucleótidos (dNTP's), 1 µl Taq DNA (Finnzyme, Thermo Scientific), 1,25 µl dos *primers Forward* e *Reverse* a 20 mM (Sigma-Aldrich®), cerca de 2 µl DNA e cerca de 34 µl água, perfazendo um volume total de reacção de 50 µl.

A Tabela 2 apresenta a sequência de nucleótidos, o tamanho da sequência e a temperatura de *annealing* dos primers usados. Os *primers* são os descritos por Desnos-Olivier e colegas (2008b).

Tab.2: *Primers* usados na reacção de amplificação das regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*; pb: pares de bases.

Região	Primer	Sequência	Tamanho amplificação	Temperatura <i>Annealing</i>
HS1	GSC1f	GAAATCGGCATATGCTGTGTC	450pb	55,5°C
	GSC1r	ATGAACGACCAATGGAGAAG		
HS2	CAS2f	ACCACCAAGATTGGTGCTG	497pb	53°C
	CAS2r	TATCTAGCACCACCAACGG		

Após optimização do protocolo de amplificação, estabeleceram-se as seguintes condições da reacção (termociclador Little Genius BIOHER®): um passo de pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos (cada um dos ciclos com três passos de 94°C durante 1 minuto, temperatura de *annealing* respectiva de cada par de primers durante 1 minuto e de 72°C durante 1 minuto) e um passo de extensão final de 72°C durante 7 minutos.

Electroforese em Gel de Agarose

A amplificação e a ausência de produtos inespecíficos foram confirmadas por electroforese em gel de agarose a 1,5%. Preparou-se o gel de agarose pesando a agarose e dissolvendo em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). Aqueceu-se até ebulição e adicionou-se o corante de DNA RedSafe® (INtRON, Biotechnology). O preparado foi colocado no molde do gel de agarose e deixou-se solidificar.

Foram aplicados 10 µl de produto de PCR juntamente com 2 µl de tampão de amostra (Bio-Rad) em cada poço do gel e deixou-se correr durante aproximadamente 40 minutos a 120 V. Para verificar se os produtos de amplificação gerados possuíam o tamanho pretendido, comparou-se com um marcador molecular de peso (100 pb) (Bio-Rad). A visualização foi efectuada num transiluminador de luz ultravioleta. Foram adquiridas imagens dos géis sempre que necessário.

Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (Ver Anexo D).

Sequenciação DNA

As amostras purificadas foram enviadas para sequenciação (LGC Genomics, Agowa, Alemanha) e as sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis nas bases de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). As sequências foram alinhadas pelo programa MEGA4 (Tamura, 2007) segundo o algoritmo ClustalX (Thompson, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das Amostras

Na tabela 3 estão resumidos os dados referentes a cada uma das amostras em estudo.

Das amostras YP0919 e YP0892, cuja proveniência é dos HUC, sabemos apenas o tipo de produto biológico e o ano em que foram isoladas as estirpes de *C. albicans*.

Os produtos biológicos dos quais as estirpes de *C. albicans* em estudo foram isoladas, são variados, sendo que na sua maioria são Hemoculturas (10), seguindo-se depois Bílis (7), Líquidos Peritoneais (3), Líquidos Pleurais (2), Líquidos Abdominais (1), Líquidos de Dreno Abdominal (1) e Líquidos não especificados (1).

As amostras foram obtidas e as estirpes isoladas nos anos de 2011 (1), 2010 (1), 2006 (17) e 2005 (6).

Das amostras provenientes do CHC, 14 pertencem a indivíduos do sexo Masculino (M) e 9 pertencem a indivíduos do sexo Feminino (F).

Na maioria dos casos, a patologia de base associada foi a ocorrência de Transplante Hepático (7). Patologias Respiratória (4), Abdominal (3), Oncológica (3), Gastrointestinal (2), do Tracto Urinário (1) também estão representadas. Três amostras são provenientes de indivíduos que apresentavam patologias de base mistas (Sépsis, Abdominal/Respiratória e Sistema Nervoso Central (SNC)/Abdominal).

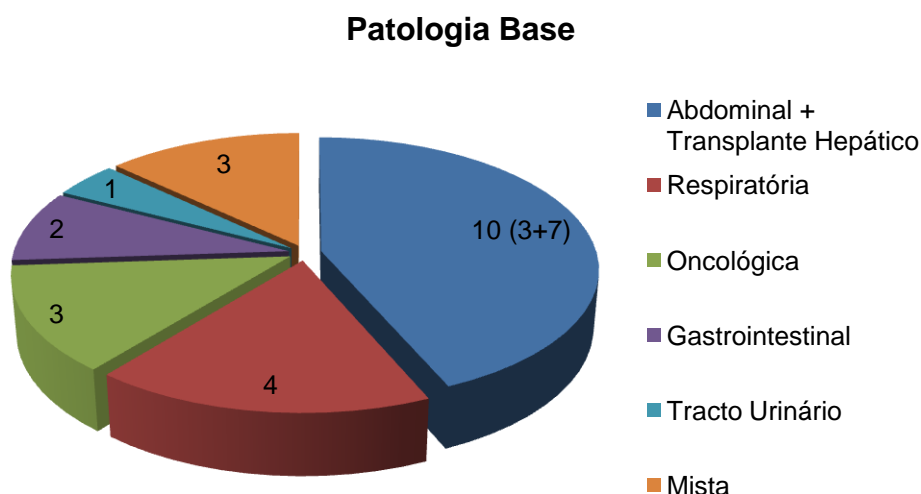


Fig. 9: Representação gráfica da distribuição das patologias de base adjacentes a cada uma das 23 estirpes provenientes do Laboratório de Microbiologia do CHC, que constituíam parte da amostra deste estudo.

É notório neste estudo (Figura 9), mesmo num número tão reduzido de amostras, que as patologias do foro abdominal, especialmente se envolver cirurgia (como é o caso dos Transplantes Hepáticos), estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de CI, tal como apontam outros estudos. O projecto EPCAN (Léon, 2009) avaliou a incidência de CI em indivíduos com patologia de tipo Médico-Cirúrgica em 5,5%. Um estudo efectuado pelo grupo espanhol CAVA avaliou essa incidência em 5,2%, sendo que esta sobe para 12,2% ao considerar apenas indivíduos com complicações de Patologia Abdominal (Ruíz-Santana *et al.*, 2007).

Quanto ao facto dos indivíduos estarem ou não, a fazer profilaxia com antifúngicos antes do isolamento das estirpes, em apenas 3 dos 23 indivíduos isso se verificou, sendo a profilaxia feita com Anfotericina B (1) e Fluconazol (2). Nos restantes 20 indivíduos, a informação de que dispomos não faz referência à profilaxia com antifúngicos. A profilaxia ou tratamento prolongado com antifúngicos é um factor importante de desenvolvimento de resistência, como documentam, entre outros, estudos de Hernandez e colaboradores (2004), Baixench e colaboradores (2007) e Thompson III e colaboradores (2008).

Tab.3:Caracterização das Amostras estudadas.

Nome	Produto Biológico	Sexo	Patologia Base	Ano ^a	Profilaxia c/ Antifúngico	Hospital
YP1131	Líq. Peritoneal	M	Abdominal	2011	N.a.	CHC
YP1130	Hemocultura	M	Abdominal	2010	Anfotericina B	CHC
YP1055	Líq. Dreno Abdominal	M	Abdominal	2006	N.a.	CHC
YP1045	Líquido Pleural	M	Respiratória	2006	N.a.	CHC
YP1025	Líq. Não Especificado	M	Transplante Hepático	2006	N.a.	CHC
YP1016	Hemocultura	M	Abdominal/ Respiratória	2006	Fluconazol	CHC
YP0985	Hemocultura	M	SNC/Abdominal	2006	N.a.	CHC
YP0940	Bílis	F	Oncológica	2006	N.a.	CHC
YP0919	Líq. Pleural	---	---	2006	---	HUC
YP0892	Líq. Peritoneal	---	---	2006	---	HUC
YP0831	Hemocultura	M	Oncológica	2006	N.a.	CHC
YP0801	Hemocultura	M	Respiratória	2006	N.a.	CHC

Tab.3:Caracterização das Amostras estudadas (continuação).

Nome	Produto Biológico	Sexo	Patologia Base	Ano ^a	Profilaxia c/ Antifúngico	Hospital
YP0798	Líq. Peritoneal	F	Gastrointestinal	2006	N.a.	CHC
YP0783	Hemocultura	M	Respiratória	2006	N.a.	CHC
YP0731	Bílis	M	Transplante Hepático	2006	N.a.	CHC
YP0727	Hemocultura	F	Tracto Urinário	2006	Fluconazol	CHC
YP0724	Bílis	M	Transplante Hepático	2006	N.a.	CHC
YP0723	Bílis	M	Transplante Hepático	2006	N.a.	CHC
YP0704	Bílis	M	Transplante Hepático	2006	N.a.	CHC
YP0667	Líq. Abdominal	F	Gastrointestinal	2005	N.a.	CHC
YP0631	Hemocultura	F	Respiratória	2005	N.a.	CHC
YP0581	Bílis	F	Transplante Hepático	2005	N.a.	CHC
YP0577	Bílis	F	Transplante Hepático	2005	N.a.	CHC
YP0569	Hemocultura	F	Oncológica	2005	N.a.	CHC
YP0537	Hemocultura	F	Sépsis	2005	N.a.	CHC

^a - Ano da colheita do produto e isolamento da estirpe.

N.a.- Sem informação acerca da profilaxia antifúngica.

Teste de Suscetibilidade à Caspofungina

Os estudos de sensibilidade aos antifúngicos revestem-se de crucial importância dado que permitem otimizar decisões clínicas sobre a terapêutica mais adequada a cada indivíduo.

A avaliação da susceptibilidade do conjunto de 25 estirpes de *C. albicans* em estudo à CSF, foi efectuada pelo método de microdiluição em caldo, descrito pelo CLSI no documento M27-A3. Este método é dirigido ao teste de susceptibilidade de fungos que causam doença invasiva e foi desenvolvido de forma a garantir uma concordância dos resultados inter-laboratoriais de susceptibilidade dos fungos aos agentes antifúngicos (CLSI, 2008). Factores técnicos como preparação e tamanho do inóculo, meio de cultura utilizado e seu pH, temperatura e tempo de incubação e dificuldades na interpretação das CIM, influenciam os resultados do teste (Cantón *et al.*, 2009).

A preparação do antifúngico e diluição do mesmo no meio RPMI 1640 para obtenção das diferentes concentrações, bem como a preparação do inóculo basearam-se no método de referência descrito no documento acima mencionado.

Após a adição do inóculo às placas *multiwell* de 96 poços previamente preparadas, as mesmas foram incubadas a 35°C, durante 24 horas. No final das 24 horas de incubação procedeu-se a uma primeira avaliação dos resultados, efectuando-se uma leitura visual do crescimento das estirpes em cada poço da placa. No entanto, deparámo-nos com uma dificuldade de crescimento das estirpes, o que impossibilitava a leitura da CIM, que para as equinocandinas é definida como a concentração de droga mais baixa que produz um decréscimo proeminente na turbidez e que se traduz numa redução do crescimento de aproximadamente 50% comparativamente ao poço de controlo de crescimento. Incubaram-se as placas novamente a 35°C e leram-se, novamente, os resultados às 48 horas. Na figura 10 podemos observar uma placa *multiwell* de 96 poços onde se testaram as amostras YP0537 e YP0569.



Fig.10: Placa *multiwell* onde se efectuou, em triplicado, o teste de susceptibilidade à CSF das amostras YP0537 e YP0569.

Os resultados das CIM, às 48 horas de incubação, das estirpes testadas, encontram-se descritos na tabela 4 e representados na figura 11.

Tab.4: Concentrações Inibitórias Mínimas das amostras estudadas, obtidas por leitura visual às 48 horas de incubação, pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). S: Susceptível.

Estirpe	Microdiluição em Caldo	
	CIM (µg/ml)	Interpretação
YP1131	0.125	S
YP1130	0.125	S
YP1055	0.125	S
YP1045	0.125	S
YP1025	0.125	S
YP1016	0.25	S
YP0985	0.125	S
YP0940	0.125	S
YP0919	0.25	S
YP0892	0.125	S
YP0831	0.25	S
YP0801	0.125	S
YP0798	0.25	S
YP0783	0.0625	S
YP0731	0.25	S
YP0727	0.25	S
YP0724	0.125	S
YP0723	0.125	S
YP0704	0.125	S
YP0667	0.125	S
YP0631	0.125	S
YP0581	0.125	S
YP0577	0.0625	S
YP0569	0.0625	S
YP0537	0.25	S

No documento de referência que serviu de base a este estudo, a interpretação dos resultados determina que um valor de $\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ é preditivo de susceptibilidade, classificando assim estirpes com valores de $\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ como susceptíveis (S), e estirpes com valores de $\text{CIM} > 2 \mu\text{g/ml}$ como não susceptíveis. A designação Não Susceptível (NS) ao invés da designação Resistente (R) era, à data de elaboração do referido documento, mais adequada, visto não serem ainda frequentes relatos de estirpes resistentes a qualquer uma das drogas da classe das equinocandinas (Pfaller, 2008b).

Pela análise dos resultados obtidos (ver Figura 11 e Tabela 4), podemos observar que, de entre as 25 estirpes de *C. albicans* que compõem o universo amostral deste estudo, e à luz dos pontos de corte definidos para as equinocandinas no documento M27-A3, todas elas são consideradas Susceptíveis, sendo que 3 apresentaram um valor de CIM de $0,0625 \mu\text{g/ml}$, 15 apresentaram um valor de $0,125 \mu\text{g/ml}$ e 7 apresentaram um valor de $0,25 \mu\text{g/ml}$. Não se obtiveram valores de CIM inferiores a $0,0625 \mu\text{g/ml}$ nem superiores a $0,25 \mu\text{g/ml}$.

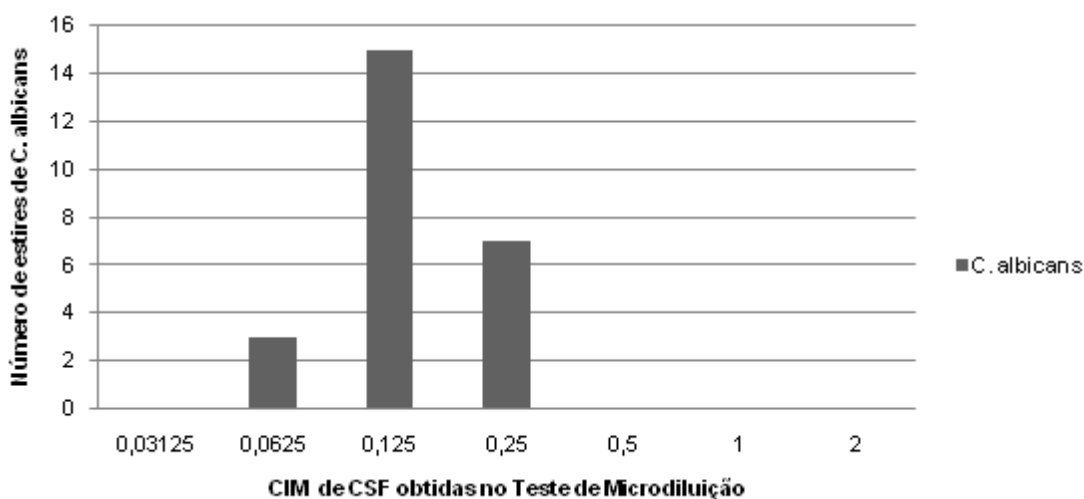


Fig. 11: Representação gráfica da distribuição das CIM de CSF ($\mu\text{g/ml}$) obtidas por leitura visual, às 48 horas de incubação, no Teste de Microdiluição em Caldo, para as 25 estirpes que constituíam a amostra deste estudo.

Por outro lado, tendo em consideração os novos pontos de corte propostos pelo Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI (Pfaller *et al.*, 2011), de $S \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$, todas as estirpes testadas neste estudo são, igualmente, consideradas Susceptíveis, apesar de sete amostras se situarem no limite mínimo considerado para a susceptibilidade.

A ausência de estirpes resistentes ou com susceptibilidade reduzida à CSF no grupo das 25 amostras que fazem parte deste estudo é facilmente explicada:

1. Em primeira análise, pode dizer-se que a dimensão da amostragem incluída neste estudo é muito reduzida, havendo, naturalmente, uma diminuição da probabilidade de detecção de estirpes resistentes ou com susceptibilidade reduzida ao antifúngico avaliado, principalmente se tivermos em consideração que, apesar de ser um fenómeno que se vai observando cada vez mais, ainda são pouco frequentes os casos de resistência às equinocandinas, com uma frequência de 0,2 a 3% (Lyon *et al*, 2010; Castanheira *et al*, 2010).

2. Por outro lado, e analisando o ano de isolamento de cada uma das estirpes de *C. albicans* em estudo (Tabela 3), é possível observar que a maioria delas foram isoladas do produto biológico de origem nos anos de 2005 e 2006, ou seja, pouco tempo depois da aprovação da CSF pela FDA (Food and Drug Administration), em 2004 (Pasqualotto *et al.*, 2005). Apesar de haver relatos de resistência à CSF em 2004, esta ocorreu em indivíduos com VIH/SIDA e no decorrer do tratamento com CSF (Hernandez *et al*, 2004), e no nosso estudo nenhuma das estirpes de *C. albicans* em estudo foi isolada de pacientes com patologia de base VIH/SIDA, nem em pacientes a realizar terapia prévia com CSF.

3. Por último, podemos observar também na tabela da caracterização das amostras estudadas (Tabela 3) que, existe uma lacuna de tempo relativamente extensa, desde 2007 a 2009, período durante o qual não foram adicionadas estirpes de *Candida sp.* à colecção de Fungos da Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, da qual foram seleccionadas as estirpes de interesse para este estudo. Certamente que, neste período, houve isolamento de estirpes de *C. albicans* causadoras de infecções fúngicas invasivas, quer no CHC, quer nos HUC, uma vez que a tendência, nestes últimos anos é para um aumento das mesmas. A probabilidade de haver isolamento de estirpes de *C. albicans* resistentes ou com reduzida sensibilidade à CSF durante este período, também seria maior, visto que se multiplicam os casos de falha na terapêutica devido à existência de mutações no gene FKS, principalmente em casos de tratamento antifúngico prolongado (Hernandez *et al.*, 2004; Laverdière, 2006; Baixench *et al.*, 2007).

Num estudo de susceptibilidade levado a cabo por Lyon e colaboradores (2010), nos Estados Unidos da América, entre 2004 e 2007, em que o número de *C. albicans* que compõem a amostragem era bastante elevado (2563 isolados), a percentagem destas resistentes à CSF foi de apenas 0,2%, ou seja, 5 isolados resistentes. Num estudo de

vigilância de susceptibilidade às equinocandinas, durante o período de um ano, na Suécia (Axner-Elings *et al.*, 2011), embora usando o método Etest e com leitura às 48 horas de incubação, dos 81 isolados de *C. albicans* testados, apenas 1 apresentava valor de CIM classificado como resistente (0,5 µg/ml), representado apenas 1,2 % do total de isolados de *C. albicans*. Castanheira e colaboradores (2010), num grupo de 133 estirpes de *Candida* isoladas durante os anos de 2006 e 2007, seleccionadas aleatoriamente, identificaram apenas 1 isolado de *C. albicans* resistente, entre 32 isolados, representando cerca de 3%.

Futuramente, seria interessante alargar este estudo a um número maior de isolados de *C. albicans* bem como a outras espécies de *Candida*, visto que cada vez mais estas últimas ganham importância a nível clínico, como o provam os vários relatos de resistência às equinocandinas por parte dessas espécies não-*albicans*. Interessante seria também testar em simultâneo as três equinocandinas disponíveis, CSF, AND e MIC, utilizando não só o método de referência de Microdiluição em caldo do CLSI, mas também métodos que mais facilmente se poderão adaptar à realidade dos Laboratórios de Microbiologia de rotina, como é o caso da técnica de Etest ou da técnica de difusão em disco, de forma a poder comparar resultados das várias técnicas na detecção de estirpes resistentes/com sensibilidade reduzida a estes antifúngicos.

Análise do gene *FKS1*

Como um dos objectivos deste estudo tínhamos a análise do gene *FKS1* para pesquisa de mutações nas regiões HS1 e HS2, nas estirpes em que o resultado obtido para o teste de sensibilidade à CSF indicasse resistência ou sensibilidade reduzida. Como, dentro do grupo de 25 estirpes de *C. albicans* testadas, não foram encontradas estirpes que satisfizessem esse critério, fomos avaliar a presença ou ausência das mutações em questão naquelas em que se obteve um valor de CIM de 0,25 µg/ml, o valor limite de susceptibilidade à CSF, proposto recentemente pelo Subcomité para os Testes de Antifúngicos do CLSI (Pfaller *et al.*, 2011).

De acordo com o critério então definido, procedeu-se então à extracção de DNA das amostras YP1016, YP0919, YP0831, YP0727, YP0798, YP0731 e YP0537, que

doravante, por uma questão de facilidade de enumeração das amostras, passarão a ser designadas, respectivamente, por amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Após a extracção de DNA de cada uma das amostras supra-citadas, da verificação da sua pureza e quantificação, procedeu-se à amplificação das sequências pretendidas, utilizando os primers utilizados por Desnos-Olivier e colaboradores (2008b) e descritos na tabela 2 (Secção de Material e Métodos).

O primeiro par de *primers* amplifica um fragmento de 450 pb (pares de bases) do gene *FKS1*, que contém a região HS1, sendo as mutações mais importantes a nível desta região, aquelas situadas entre os aminoácidos das posições 641 e 649. O segundo par de *primers* utilizado amplifica um fragmento com 497 pb, tendo como alvo a região HS2, em que as mutações mais frequentemente observadas são as que ocorrem entre os aminoácidos 1345 e 1365 (Walker *et al.*, 2010). É conhecido que mutações pontuais a nível destas duas regiões conferem susceptibilidade reduzida às equinocandinas em espécies de *Candida*, sendo a substituição do aminoácido serina pelos aminoácidos fenilalanina, prolina ou tirosina na posição 645 a que mais frequentemente se observa (Walker *et al.*, 2010). Segundo García-Effron (2009c), as substituições do aminoácido serina na posição 645 são aquelas que apresentam valores de CIM mais elevados, enquanto alterações de aminoácidos nas posições 648 e 649 da região HS1 e na região HS2 têm efeitos menos pronunciados.

Nas figuras 12, 13 e 14, podemos observar os resultados das corridas dos produtos de amplificação, pela técnica de PCR, em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE, para as duas regiões, HS1 e HS2.

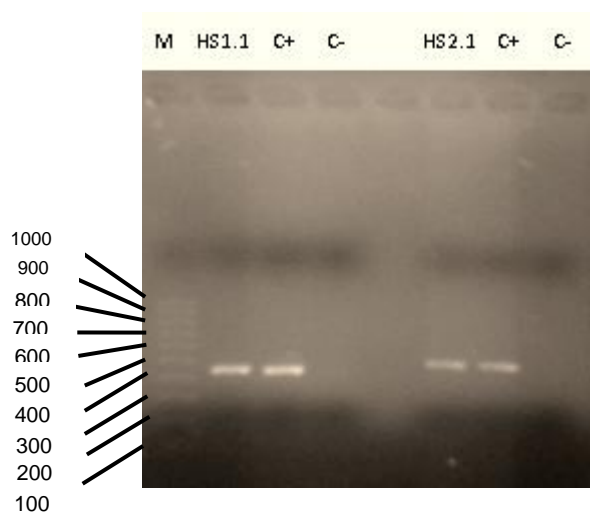


Fig.12: Amplificação das regiões HS1 (450pb) e HS2 (497pb) da amostra 1; M: Marcador de Peso Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo.

Na figura 12 está representado o primeiro teste de amplificação das regiões pretendidas, relativamente apenas à amostra 1, sendo possível visualizar uma banda com 450 pb, na segunda posição do gel de agarose, e uma banda de maior peso molecular, com aproximadamente 500 pb, na sexta posição do gel. Na terceira e sétima e na quarta e oitava posições encontram-se os controlos positivos e negativos de amplificação, para as regiões HS1 e HS2, respectivamente. Os controlos positivos garantem-nos que a reacção de PCR decorreu normalmente e que podemos confiar nos resultados obtidos para as nossas amostras, enquanto os controlos negativos asseguram que os resultados que se obtiveram nas amostras não se devem a contaminações.

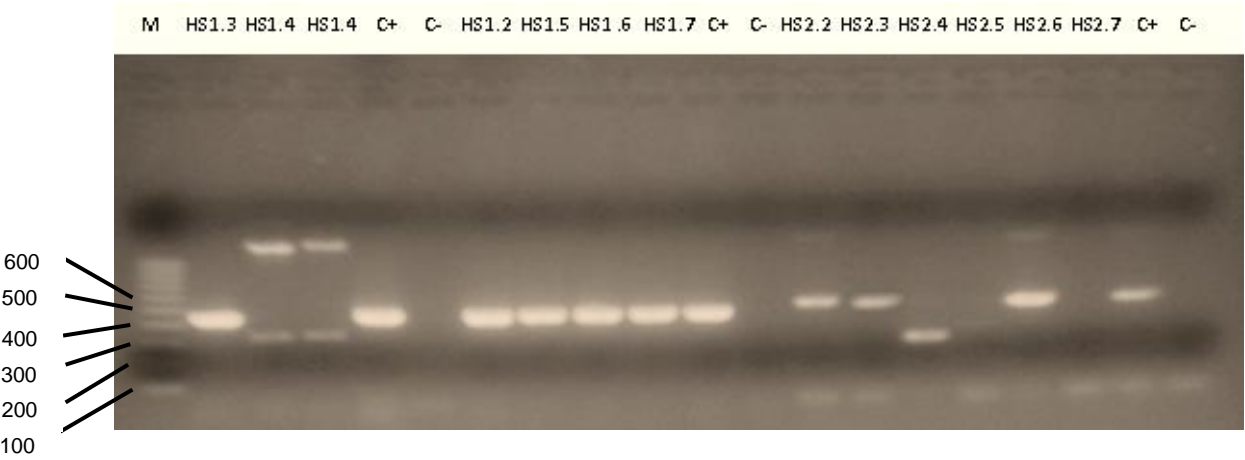


Fig.13: Amplificação das amostras 2, 3, 4 (duplicado), 5, 6 e 7 para a região HS1 e das amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 para a região HS2; M- Marcador de Peso Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo.

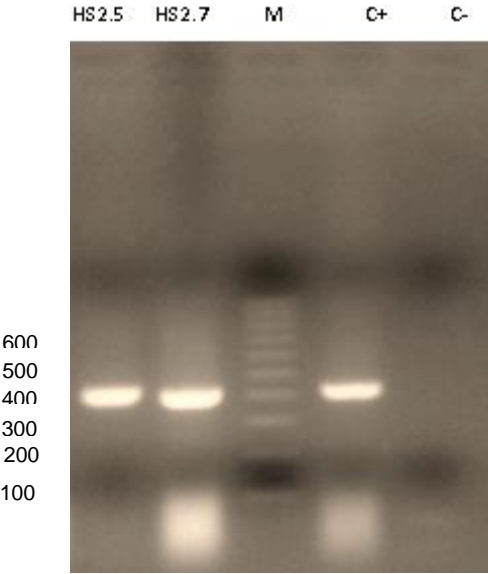


Fig.14: Repetição das amostras 5 e 7 da região HS2; M- Marcador de Peso Molecular; C+: Controlo positivo; C-: Controlo negativo.

Na figura 13 podemos observar que foi possível amplificar correctamente as amostras 2, 3, 5, 6 e 7 da região HS1, através da visualização do fragmento de 450 pb. Para a região HS2 foi possível obter fragmentos com o peso molecular pretendido, das amostras 2,3 e 6. As amostras 5 e 7 não revelaram qualquer banda, indicando que não houve amplificação de DNA durante a reacção de PCR, para essas amostras. Procedeu-se novamente à amplificação das mesmas e a electroforese em gel de agarose está representada na figura 14, onde se pode observar a existência de uma banda com cerca de 500 pb, para cada uma das amostras.

Na electroforese em gel de agarose representada na figura 13, podemos verificar que a tentativa de amplificação dos fragmentos pretendidos para a amostra 4 foi realizada em duplicado (a reacção de PCR foi realizada com duas concentrações distintas de DNA) sendo possível distinguir dois fragmentos de DNA, com tamanho situado entre os 300 e os 400 pb, tanto para a região HS1, como para a região HS2. A impossibilidade de amplificação das regiões HS1 e HS2 com os pares de primers utilizados, levou-nos a pensar poder não se tratar de um isolado de *C. albicans*, isto é, de haver um erro na identificação deste isolado clínico.

A amostra 4 (YP0727) foi anteriormente identificada como sendo *C. albicans*, por técnicas convencionais de identificação e, supostamente, por técnicas de biologia molecular. No entanto, perante a nossa incapacidade de amplificar as regiões HS1 e HS2, e após várias tentativas, procedeu-se a uma nova identificação da estirpe recorrendo a métodos moleculares de identificação. Assim, por amplificação da região ITS-5.8S do DNA ribossomal de fungos (Kurtzman e Robnett, 1998), foi possível determinar que se tratava, não de uma, mas de duas estirpes, *C. albicans* e *C. glabrata*. Embora a confirmação deste facto invalide a inclusão desta amostra neste estudo, trata-se de um aspecto importante que muitas vezes passa despercebido no diagnóstico clínico.

De facto, segundo Alves da Silva e colaboradores (2011), as infecções fúngicas mistas representam 3 a 5% do total de candidémias, apesar da pouca literatura existente a documentar a ocorrência destas infecções. Num estudo efectuado por Hsu e colaboradores, CI causadas por agentes mistos representavam 21,3% dos casos (Hsu *et al.*, 2010). Esta dificuldade de identificação de mais do que uma estirpe de fungos leveduriformes causadores de CI, principalmente candidémias, advém do facto de, na sua maioria, essa identificação ainda ser feita com recurso a técnicas de Microbiologia tradicionais, quer de cultura, quer de identificação (Jensen *et al.*, 2007). A melhoria dos métodos de diagnóstico destas infecções, nomeadamente com recurso a técnicas moleculares, permite o relato cada vez mais frequente, de casos de infecções fúngicas

mistas (Alves da Silva *et al.*, 2011). Assim, e acedendo aos dados clínicos desta amostra, foi possível determinar que, inicialmente foi identificada uma *C. glabrata* numa urina, tendo-se iniciado a terapêutica com fluconazol. Posteriormente, foi então identificada *C. albicans* no sangue. Concluímos então que, a amostra à qual foi atribuído o número YP0727, trata-se de um exemplo em que terá ocorrido uma infecção mista no sangue e em que, pela impossibilidade de distinguir morfologicamente (macro ou microscopicamente) as duas espécies aí representadas, *C. albicans* e *C. glabrata*, o que ficou depositado na colecção de fungos da qual se seleccionaram as nossas amostras, foi uma mistura das duas estirpes. Os passos seguintes serão o isolamento, por esgotamento, de várias colónias presentes, seguida da identificação, por biologia molecular, para assim serem guardados os dois isolados do mesmo produto, sangue, e para um mesmo doente.

Claro está que, os resultados obtidos no teste de susceptibilidade à CSF para esta estirpe estão invalidados, visto que, para a realização de qualquer teste de susceptibilidade, é imperativo a existência de culturas puras das estirpes a testar, o que, obviamente, não se verificou.

Excluindo então a amostra 4 e depois da identificação das bandas pretendidas nos géis de electroforese referentes às amostras 1, 2, 3, 5, 6 e 7, procedeu-se ao seu corte para purificação do DNA nelas contido. Essa purificação dos produtos de PCR, através do gel de agarose, foi realizada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, da Promega. Este sistema baseia-se na capacidade do DNA de se ligar a uma membrana de sílica em presença de sais caotrópicos, normalmente sais de guanidina, de forma a remover *primers* e nucleótidos em excesso, permitindo uma recuperação de até cerca de 95% do DNA (<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20CleanUp%20System%20Protocol.ash>).

Após recepção dos resultados de sequenciação de todas as amostras, realizado pela LGC Genomics (Agowa, Alemanha), as sequências obtidas foram comparadas com a sequência de *C. albicans* de referência, depositada no GenBank.

Região HS1

Na figura 15 está representado o alinhamento de nucleótidos, obtido por sequenciação, das amostras 1, 2, 3, 5, 6 e 7, relativamente à sequência de *C. albicans* utilizada como referência. Esta corresponde à sequência GQ456066.1 do GenBank, utilizado por Niimi e colaboradores (2010), e que corresponde à sequência completa do gene da subunidade catalítica da enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase (GSC1) da estirpe de *C. albicans* ATCC 90028.

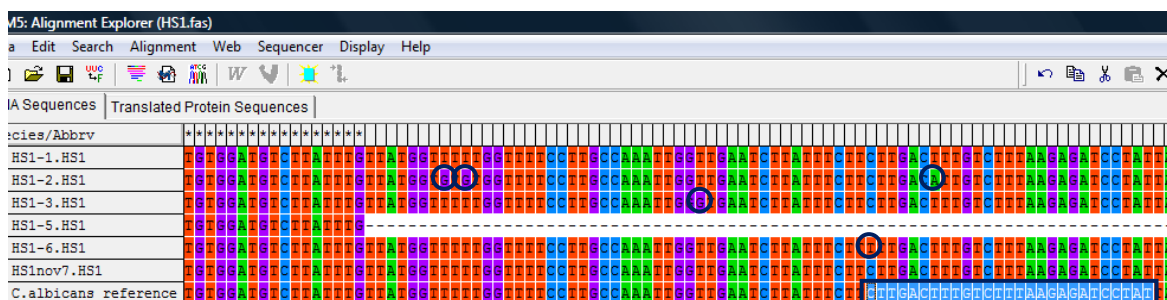


Fig. 15: Alinhamento de nucleótidos das amostras 1, 2, 3, 5, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região HS1.

Como se pode observar, da amostra 5 só foi possível sequenciar uma pequena parte, não sendo viável a verificação da presença ou ausência de mutações na zona que compreende os nucleótidos 1921 a 1947, que corresponde à zona dos aminoácidos 641 a 649.

Na figura 16 podemos observar o padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 7, que corresponde a uma sequência normal.

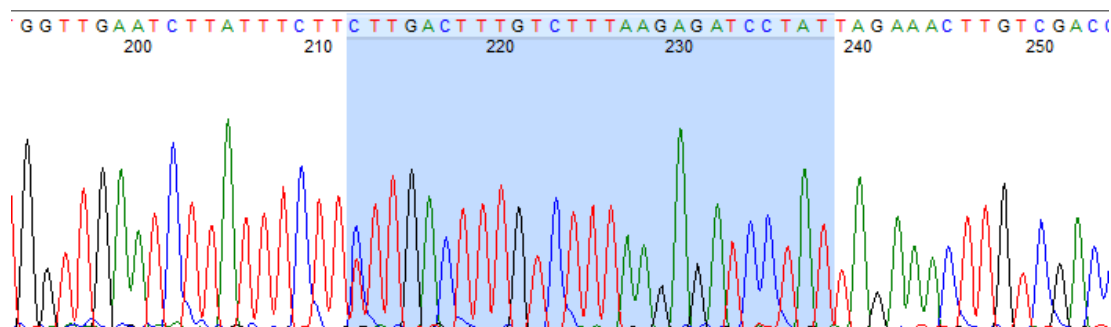


Fig. 16: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 7, para a região HS1.

posição 628 (F628C).

Este facto também é verdadeiro para a amostra 3, cuja mutação a nível do nucleótido 1905, com alteração do nucleótido T pelo nucleótido G, dá origem à alteração do aminoácido Valina pelo aminoácido Glicina, na posição 636 (V636G).

Até à data, não foram encontrados estudos na literatura que descrevam a ocorrência destas duas mutações, F628C e V636G, em *C. albicans*, sendo as mais frequentemente descritas e associados à resistência à CSF as mutações ocorridas no aminoácido Serina na posição 645 (Walker *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2011).

A figura 18 ilustra o padrão de bandas obtido para a amostra 2, estando assinalado o polimorfismo encontrado nesta amostra. A ocorrência de uma única banda nesta posição indica que existe homozigotia, correspondendo a um alelo AA.

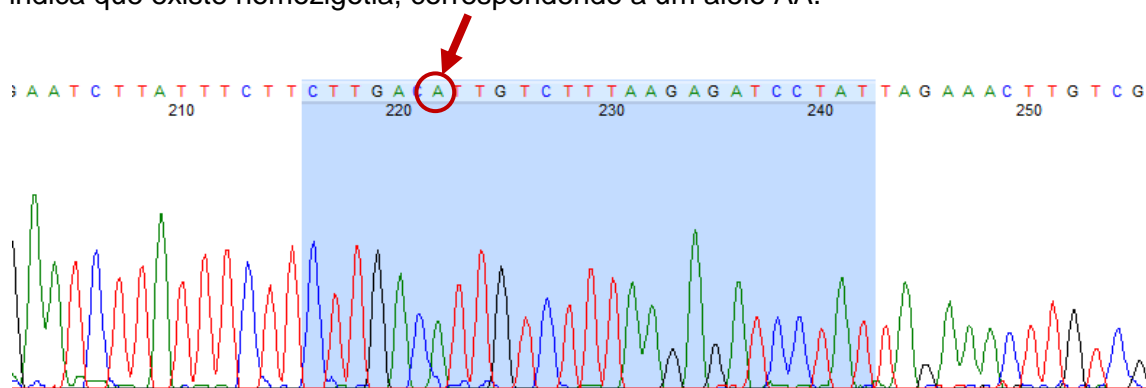


Fig. 18: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 2, para a região HS1.

Na figura 19 está representado o polimorfismo encontrado na amostra 6. Ao observarmos o padrão de bandas, podemos ver dois sinais para o mesmo nucleótido, um de C e outro de T (assinalado com a seta), o que nos leva a concluir que existe heterozigotia para este polimorfismo, o que corresponde a um alelo CT.

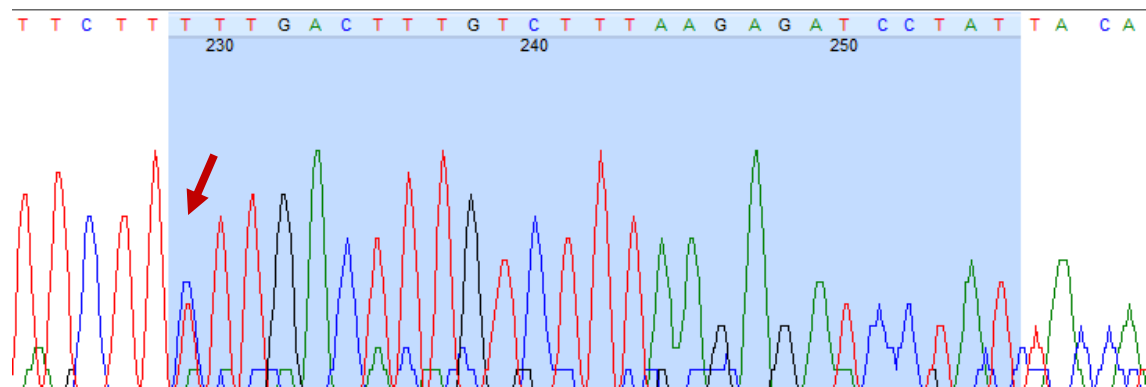


Fig. 19: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 6, para a região HS1.

A existência das mutações V636G e F628C verificada nas amostras 3 e 2, respectivamente, podem carecer de estudos posteriores confirmatórios e detalhados, de forma a perceber se poderão ou não tratar-se de novas mutações que conferem susceptibilidade reduzida às equinocandinas.

Independentemente da existência destes polimorfismos e mutações, nenhuma das amostras testadas apresenta mutações a nível da região HS1, entre os aminoácidos 641-649, verificando-se uma correspondência com os resultados que tinham sido obtidos no teste de sensibilidade à CSF.

Região HS2

Da análise do alinhamento da sequência de nucleótidos das amostras estudadas com a sequência de referência de *C. albicans*, e para a região HS2, que compreende os nucleótidos 4033-4095, é possível determinar que nenhuma das amostras apresenta mutação (Fig.20). Da observação da figura 20 é notório que, da amostra 5, apenas foi sequenciada uma parte, tal como aconteceu para a região HS1, não sendo também possível inferir da presença ou ausência de mutações que conferem resistência à CSF nesta região.

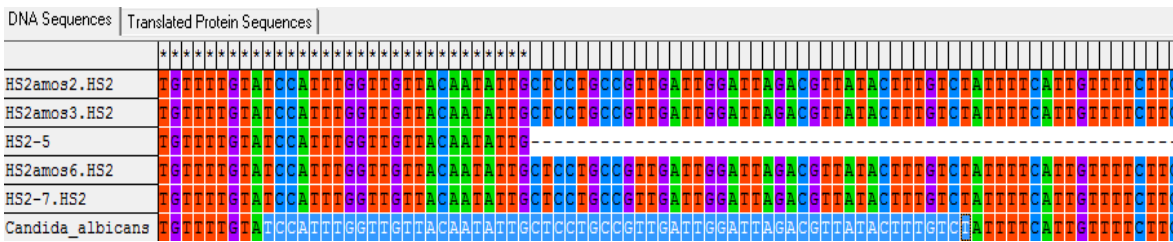


Fig. 20: Alinhamento de nucleótidos das amostras 2, 3, 5, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região HS2.

Como era esperado, no alinhamento da sequência de aminoácidos das amostras em questão com a sequência de aminoácidos da estirpe de *C. albicans* de referência, estas não evidenciam a existência de quaisquer alterações nos aminoácidos das posições 1345 a 1365 (Fig.21), apresentando-se todas com uma sequência de aminoácidos igual à da *C. albicans* de referência.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences

HS2amos2.HS2	NSLAHEAIMCSYNKDVPIIDVLYPFGCYNIAFAVDWIRRYTLISIFIVFFISFI
HS2amos3.HS2	NSLAHEAIMCSYNKDVPIIDVLYPFGCYNIAFAVDWIRRYTLISIFIVFFISFI
HS2amos6.HS2	NSLAHEAIMCSYNKDVPIIDVLYPFGCYNIAFAVDWIRRYTLISIFIVFFISFI
HS2-7.HS2	NSLAHEAIMCSYNKDVPIIDVLYPFGCYNIAFAVDWIRRYTLISIFIVFFISFI
Candida_albicans	NSLAHEAIMCSYNKDVPIIDVLYPFGCYNIAFAVDWIRRYTLISIFIVFFISFI

Fig. 21: Alinhamento de aminoácidos das amostras 2, 3, 6 e 7, após sequenciação, relativamente à sequência de *C. albicans* de referência, para a região HS2.

A figura 22 representa o padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 2, apresentando um padrão de bandas normal.

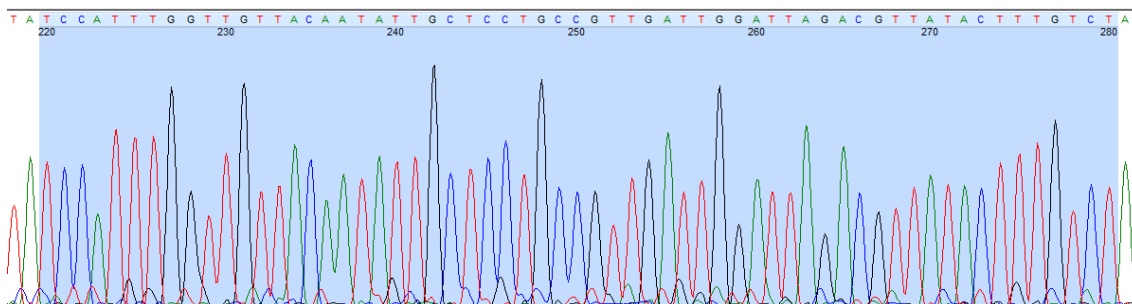


Fig. 22: Padrão de sequenciação, em bandas, da amostra 2, para a região HS2.

Tal como para a região HS1, os resultados obtidos para as amostras testadas para a região HS2 mostram uma concordância com os resultados obtidos no teste de susceptibilidade, não tendo sido detectadas mutações entre os aminoácidos 1345-1365, que, reconhecidamente, alteram a sensibilidade da enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase para a CSF e que, concomitantemente, conferem resistência, em estirpes de *C. albicans*. Como exemplo temos o estudo efectuado por Laverdière e colaboradores, em 2006, que descrevem um caso de estudo, no qual a mutação R1361H na região HS2 em *C. albicans* aparece associada à perda de sensibilidade às equinocandinas, após terapia prolongada com micafungina.

Da amostra 1 não foi possível obter nenhum dado de sequenciação da região HS2 e também não temos dados suficientes para analisar a amostra 5, quer para a região HS1, quer para a região HS2.

Estudos que envolvem sequenciação são estudos que requerem grande disponibilidade de tempo, em especial quando a sequenciação é executada por entidades externas, como foi o caso. Os tempos de espera são prolongados e resultados inconclusivos requerem sempre novas amplificações e/ou nova extração de DNA das amostras. Por vezes é também necessário desenhar *primers* que amplifiquem uma região mais ampla que os *primers* utilizados de forma a melhor se sequenciar a zona-alvo.

Claro é que, o tempo, neste trabalho, foi um factor muito limitante, pelo que, mais tempo seria necessário para completar o estudo das amostras 1 e 5.

Tal como foi referido para os resultados do teste de susceptibilidade à CSF, o número de estirpes de *C. albicans* que constitui a amostra do nosso estudo é bastante reduzido. Estudos que envolvem a análise das mutações do gene *FKS1* que conferem resistência ou susceptibilidade reduzida às equinocandinas, são estudos com um número de isolados substancialmente mais elevado, tal como acontece no estudo efectuado por Castanheira e colaboradores (2010). No entanto, a maioria das publicações científicas acerca deste tema, nos quais são descritas estas mutações, são estudos de casos pontuais de falha terapêutica (Baixench *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2004) ou estudos que envolvem a análise de estirpes resistentes já catalogadas e conservadas como no estudo de Garcia-Effron e colaboradores (2009c).

Ao aumentarmos o leque de estirpes analisadas, alargando também este estudo a espécies de *Candida* não-*albicans*, maior será a possibilidade de encontrar mutações associadas à resistência às equinocandinas.

CONCLUSÃO

A incidência e prevalência de Candidíases Invasivas têm vindo a aumentar drasticamente desde os anos 80, especialmente na população que compreende indivíduos imunocomprometidos ou indivíduos hospitalizados com doenças de base relativamente graves, na qual a mortalidade e morbilidade dessas infecções atingem proporções substanciais.

Nos últimos anos, muitos têm sido os progressos feitos na tentativa de uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos moleculares que conferem resistência às equinocandinas e outros antifúngicos de uso corrente para o combate das infecções fúngicas invasivas. Existe, no entanto, uma lacuna na determinação do impacto prático destes mecanismos na realidade clínica e um melhor entendimento destes é essencial para a implementação de um tratamento rápido e eficiente de doentes com estas infecções, de modo a diminuir os seus efeitos nefastos.

É, hoje, de entendimento comum, que o principal mecanismo de resistência às equinocandinas é a ocorrência de mutações pontuais a nível da subunidade Fks1 da enzima $\beta(1,3)$ – glucano sintase, o presumível alvo das drogas desta classe de antifúngicos. Estas mutações alteram a sensibilidade da enzima às drogas, resultando numa resistência ou susceptibilidade reduzida às mesmas.

De facto, a aplicação dos testes de susceptibilidade *in vitro*, principalmente quando complementado com o uso de métodos moleculares, tem sido de uma importância crucial no que respeita à detecção de estirpes de *Candida* potencialmente resistentes ou com sensibilidade diminuída às drogas da classe das equinocandinas, bem como no reconhecimento e caracterização dos vários mecanismos de resistência às mesmas entre os isolados clínicos de *Candida sp.*.

Em adição à emergência de resistências e, tendo em conta o custo elevado das drogas da classe das equinocandinas comparativamente a outras drogas antifúngicas, deve haver reservas no que respeita ao seu uso corrente e indiscriminado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves da Silva, F. H., Paço, F. R., Reis, E., Amaral, V.- *Saccharomyces cerevisiae* infection – an unusual pathogen in the ICU. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 23:1(2011), 108-111.

Arendrup, M.C., G. Garcia-Effron, C. Lass-Flörl, A.G. Lopez, J.L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, Perlin, D.S.- Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and IsoSensitest media. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 54(2010), 426-439.

Ásmundsdóttir, L. R., Erlendsdóttir, H., Haraldsson, G., Guo, H., Xu, J., Gottfredsson, M.- Molecular Epidemiology of Candidemia: Evidence of Clusters of Smoldering Nosocomial Infections. **Clinical Infectious Diseases**. 47(2008), 17-24.

Axner-Elings, M., Botero-Kleiven, S., Jensen, R. H., Arendrup, M. C.- Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Isolates Collected during a 1-Year Period in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**. 49:7 (2011), 2516-2521.

Baixench, M.T., Aoun, N., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Ramires, S., Piketty, C., Dannaoui, E.- Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 59(2007), 1076-1083.

Balashov, S. V., Park, S., Perlin, D.- Assessing Resistance to the Echinocandin Antifungal Drug Caspofungin in *Candida albicans* by Profiling Mutations in *FKS1*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 5:6(2006), 2058-2063.

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., Monk, B. C.- *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. **Microbiology**. 153(2007), 3211-3217.

Cantón, E., Pemán, J., Romero, M., Valentín, A., Gobernado, M.- The fungicidal activity and paradoxical effect of caspofungin on yeasts. Influence of culture medium and incubation time. **Revista Espanola de Quimioterapia**, 20:4 (2007), 433-441.

Cantón, E., Espinel-Ingroff, A., Pemán, J.- Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 7:1 (2009), 107-119.

Cappelletty, D. M., Jung, R.- Anidulafungin and its role in *Candida* infections. **Infection and Drug Resistance**. 2(2009), 51-60.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W.- The Fungi, 2nd edition. Academic Press, 2001. ISBN 0-12-738445-6.

Carrillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A., Quindós, G.- Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Espanola de Quimioterapia**. 19:2(2006), 130-139.

Castanheira, M., Woosley, L. N., Diekema, D. J., Messer, S. A., Jones, R. N., Pfaller, M. A.- Low Prevalence of *fkp1* Hot Spot 1 Mutations in a Worldwide Collection of *Candida* Strains. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 54:6 (2010), 2655-2659.

Chamilos, G., Lewis, R. E., Albert, N., Kontoyiannis, D. P.- Paradoxical Effect of Echinocandins across *Candida* Species In Vitro: Evidence for Echinocandin-Specific and *Candida* Species-Related Differences. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 51:6(2007), 2257-2259.

Chandrasekar, P. H., Sobel, J. D.- Micafungin: A New Echinocandin. **Clinical Infectious Diseases**. 42(2006), 1171-8.

Chen, S. C. A., Sorrell, T. C.- Antifungal Agents. **Medical Journal of Australia**. 187:7(2007), 404-409.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3(28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Deacon, J.- Fungal Biology, 4th Ed. Blackwell, 2006. ISBN-10: 1-4051-3066-0.

Desnos-Ollivier, M., Dromer, F., Dannaoui, E.- Detection of Caspofungin Resistance in *Candida spp.* by Etest. **Journal Of Clinical Microbiology**. 46:7(2008a), 2389-2392.

Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Raoux, D., Hoinard, D., Dromer, F., Dannaoui, E.- Mutations in the *FKS1* Gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* Correlate with Elevated Caspofungin MICs Uncovered in AM3 Medium Using the Method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 56:9(2008b), 3092-3098.

Dismukes, W. E., Pappas, P. G., Sobel, J. D.- Clinical Mycology, 1st ed. Oxford University Press, 2003. ISBN 0-19-514809-6.

Douglas, C. M., D'Ippolito, J.A., Shei, G.J., Meinz, M., Onishi, J., *et al.*- Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 41(1997), 2471-2479.

Eisman, B., Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D., Nombela, C., Pla, J.- The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**. 5(2006), 347-358.

Enoch, D. A., Ludlam, H. A., Brown, N. M.- Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**. 55(2006), 809-818.

Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Cantón, E., Pemán, J.- Emerging Resistance to Azoles and Echinocandins: Clinical Relevance and Laboratory Detection. **Current Fungal Infection Reports**. 4(2010), 186-195.

Espinel-Ingroff, A.- Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**. 26:1(2009), 15-22.

Espinel-Ingroff, A.- Mechanisms of resistance to antifungal agents- Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**. 25(2008), 101-106.

Ferreira, J.A., Carr, J.H., Starling, C.E., de Resende, M.A., Donlan, R.M.- Biofilm Formation and Effect of Caspofungin on Biofilm Structure of *Candida* Species

Bloodstream Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 53:10 (2009), 4377-4384.

Ferreira, W. F. C., de Sousa, J. C. F.- Microbiologia. Lisboa-Porto-Coimbra: LIDEL-Edições Técnicas, 1998. ISBN 9972-757-024-0. Vol. I.

Fleischhacker, M., Radecke, C., Schulz, B., Ruhnke, M.- Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 27(2008), 127-131.

Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Zachary Perfect, B., Rogg, L. E., Perfect, J. R., Steinbach, W. J.- Transcriptional Regulation of Chitin Synthases by Calcineurin Controls Paradoxical Growth of *Aspergillus fumigatus* in Response to Caspofungin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 54:4(2010), 1555-1563.

Garcia-Effron, G., Kontoyiannis, D., Lewis, R.E., Perlin, D.S.- Caspofungin resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 52(2008), 4181-4183.

Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D.S.- Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida sp.* isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 49(2009a), 3264-3273.

Garcia-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D., Perlin, D. S.- Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3- β -D-Glucan Synthase: Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 53:9(2009b), 3690-3699.

Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D.S.. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthase for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 53(2009c), 112-122.

Grover, N. D.. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian Journal of Pharmacology**. 42:1(2010), 9-11.

Hernandez, S., Lopez-Ribot, J. L., Najvar, L. K., McCarthy, D. I., Bocanegra, R., Graybill, J. R.- Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive Candida esophagitis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 48 (2004), 1382-1383.-

Hogg, S.- Essential Microbiology. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005. ISBN 0 471 49753 3.

Hsu, D. I., Nguyen, M., Nguyen, L., Law, A., Wong-Beringer, A.. A multicentre study o evaluate the impact of timing of caspofungin administration on outcomes of invasive candidiasis in non-immunocompromised adult patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 65(2010), 1765-1770.

Irving, W., Boswell, T., Ala'Aldeen, D. Medical Microbiology, Taylor & Francis Group, 2006. ISBN: 1-8599-6254-8.

Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A., Meiller, T. F.- Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**. 10:1(2004), 14-19.

Jensen, J., Muñoz, P., Guinea, J., Rodríguez-Créixems, M., Peláez, T., Bouza, E.- Mixed Fungemia: Incidence, Risk Factors, and Mortality in a General Hospital. **Clinical Infectious Diseases**. 44 (2007), 109-114.

Johnson, Melissa D., Perfect, J.R.- Use of Antifungal Combination Therapy: Agents, Order, and Timing. **Current Fungal Infection Reports**. 4:2(2010), 87-95.

Kahn, J.N., Garcia-Effron, G., Hsu, M.J., Park, S., Marr, K.A., Perlin, D.S.- Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 51(2007), 1876-1878.

Kanafani, Z. A., Perfect, J. R.- Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**. 46(2008), 120-128.

Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A.- Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonia**. 56:2(2009), 211-224.

Kavanagh, K.- Fungi: Biology and Applications. John Wiley & Sons Ltd, 2005. ISBN 0-470-86702-7.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. - Color Atlas of Medical Microbiology. New York: Thieme Stuttgart, 2005. ISBN 1-58890-245-5.

Khelif, M., Bogreau, H., Michel-Nguyen, A., Ayadi, A., Ranque, S.- Trailing or Paradoxical Growth of *Candida albicans* When Exposed to Caspofungin Is Not Associated with Microsatellite Genotypes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 54:3(2010), 1365-1368.

Kurtzman C.P., Robnett C.J.- Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**. 73(1998), 331-371.

Laverdière, M., Lalonde, R. G., Baril, J., Sheppard, D. C., Park, S., Perlin, D.- Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 57(2006), 705-708.

León, C., F., Ruiz-Santana, S., León, M.A., Nolla, J., Jordá, R., Saavedra, P., Palomar, M., EPCAN Study Group- Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 28:3 (2009), 233-42.

Liu, J., Balasubramanian, M.K.- 1,3-beta-Glucan Synthase: A Useful Target for Antifungal Drugs. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**. 1:2(2001), 159-169.

Lyon, G. M., Karatela, S., Sunay, S., Adiri, Y., for the *Candida* Surveillance Study Investigators. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**. 48:4 (2010), 1270-1275.

Marie, C., White, T. C.- Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance. **Current Fungal Infection Reports**. 3:3(2009), 163-169.

Melo, A. S., Colombo, A. L., Arthington-Skaggs, B. A.- Paradoxical Growth Effect of Caspofungin Observed on Biofilms and Planktonic Cells of Five Different *Candida* Species. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 51:9(2007), 3081-3088.

Mishra, N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D. K., Singh, R.- Pathogenecity and Drug Resistance in *Candida albicans* and other Yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 54:3(2007), 201-235.

Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. - Biodiversity Of Fungi Inventory And Monitoring Methods. Elsevier Inc., 2004. ISBN 0-12-509551-1.

Munro, C. A.- Fungal echinocandin resistance. **F1000 Biology Reports**. 2:66(2010).

Munro, C.A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M.D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A.J., Gow, N.A.- The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. 63(2007), 1399-1413.

Niimi, K., Monk, B.C., Hirai, A., Hatakenaka, K., Umeyama, T., Lamping, E., Maki, K., Tanabe, K., Kamimura, T., Ikeda, F., Uehara, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Cannon, R.D. and Niimi, M.- Clinically significant micafungin resistance in *Candida albicans* involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (*FKS1*) allele followed by loss of heterozygosity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 65:5 (2010), 842-852.

Palacio, A. del, Villar, J., Alhambra, A.- Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. **Revista Iberoamericana de Micología**. 26:1(2009), 2-7.

Pasqualotto, A. C., and Denning, D. W.- New antimicrobial agents approved by the U.S. food and drug administration in 2004 and new indications for previously approved agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 49(2005), 2151.

Park, S., Kelly, R., Kahn, J.N., Robles, J., Hsu, M.J., Register, E., Li, W., Vyas, V., Fan, H., Abruzzo, G., Flattery, A., Gill, C., Chrebet, G., Parent, S.A., Kurtz, M., Teppler, H., Douglas, C.M., Perlin, D.S.- Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 49(2005), 3264-3273.

Pemán, J., Cantón, E., Valentín, A.- Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**. 25:2(2008), 124-8.

Perlin, D. S.- Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**. 10:3(2007), 121-130.

Perlin, D.S.- Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? **Current Opinion in Infectious Diseases**. 22(2009), 568-573.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Andes, D., Arendrup, M.C., Brown, S.D., Lockhart, S.R., Motyl, M., Perlin, D.S., CLSI Subcommittee for Antifungal Testing- Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**. 14:3 (2011), 164-176.

Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Kroeger, J., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J.- *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**. 46(2008a), 150-156.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Brown, S.D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M.A., Knapp, C.C., Sheehan, D.J., and Walsh, T.J.- Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. **Journal of Clinical Microbiology**. 46(2008b), 2620-2629.

Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J.- Global surveillance of *in vitro* activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 44(2006), 3533-3538.

Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A., Richard, M.L.- Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal Genetics and Biology**. 45(2008), 1404-1414.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A.- Microbiology, 5th Edition. The McGraw-Hill Companies, 2002. ISBN: 0-07-282905-2.

Ruiz-Santana, S., Castro, C., Saavedra, P., and Cava Study Group- The Cava Project: (1,3)-b-D-Glucan and *Candida* Score in Discriminating between Colonization and Invasive Candidiasis Non-Neutropenic Critically Ill Patients. **Chicago, IL: 47 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007** (Abstract M-563).

Sangamwar, A.T., Deshpande, U. D., Pekamwar, S. S.- Antifungals: Need to search for a new molecular target. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 70:4 (2008), 423-30.

Singh, S. D., Robbins, N., Zaas, A. K., Schell, W. A., Perfect, J. R., Cowen, L. E.- Hsp90 Governs Echinocandin Resistance. **PLoS Pathogens**. 5(7): e1000532.

Stevens, D. A., Espiritu, M., Parmar, R.- Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at High Drug Concentrations. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 48:9 (2004), 3407-3411.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.- MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24(2007), 1596-1599.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.- The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. 24 (1997), 4876-4882.

Thompson III, G.R., Wiederhold, N.P., Vallor, A.C., Villareal, N.C., Lewis, J.S., Patterson, T.F.- Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 52(2008), 3783-3785.

Trofa, D., Gácser, A., Nosanchuk, J. D.- *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. 21:4(2008), 606-625.

Vediyappan, G., Rossignol, T., d'Enfert, C.- Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 54:5(2010), 2096-2111.

Walker, Louise A., Gow, Neil A.R., Munro, Carol A.- Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics and Biology**. 47 (2010), 117-126.

Walker, L. A., Munro, C. A., Bruijn, I., Lenardon, M. D., McKinnon, A., Gow, N. A. R.- Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. **PLoS Pathogens**. 4:4(2008), e1000040.

Warnock, D. W.- Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**. 48:1(2007), 1-12.

Webster, J., Weber, R.- Introduction to Fungi, 3rd Edition. Cambridge University Press, 2007. ISBN-13 978-0-521-80739-5.

Wiederhold, N.P., J.L. Grabinski, G. Garcia-Effron, D.S. Perlin, and S.A. Lee.- Pyrosequencing to detect mutations in *FKS1* that confirm reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 52(2008), 4145-4148.

A. Ficha Técnica do Meio Sabouraud

Gelose Sabouraud 2 (SAB2-D)

IVD

Cultura e isolamento dos fungos

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

A gelose Sabouraud 2 é um meio recomendado para a cultura e o isolamento dos fungos a partir de estirpes/cepas ou de colheitas/coletas clínicas (1, 2, 4).

PRINCÍPIO

A presença de peptonas e de glucose favorece o desenvolvimento das estirpes/cepas fúngicas (3). O pH da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento dos fungos em relação ao desenvolvimento bacteriano.

APRESENTAÇÃO

Meio desidratado	
REF 51 020	Frasco de 500 g

COMPOSIÇÃO

Fórmula teórica após reconstituição do meio.

Este meio pode ser ajustado e/ou suplementado em função dos critérios de comportamento funcional impostos:

Peptona de caseína (bovina)	5 g
Peptona de gelatina (bovina ou porcina)	5 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Água destilada	1 l

pH 6,2

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Autoclave.
- Placas de Petri estéreis.
- Tubos autoclaváveis.
- Frascos autoclaváveis.
- Estufa de bacteriologia.
- Banhos-maria.

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- **Somente para uso em diagnóstico *in vitro***
- **Unicamente para uso profissional**
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controlo da origem e/ou do estado sanitário dos animais não pode garantir de maneira absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é recomendado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir; não inalar).

- As amostras, culturas bacterianas e produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* – Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH – Última edição", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Os meios de cultura não devem ser utilizados como materiais ou componentes de fabrico.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Não utilizar os meios cujo aspecto não esteja homogéneo (presença de aglomerados).
- Na primeira utilização, assegurar-se da integridade das tampas dos frascos.
- Fechar bem os frascos após cada utilização.
- Evitar abrir os frascos em atmosferas húmidas (vapores, condensações...).
- O comportamento funcional apresentado foi obtido com o procedimento indicado neste folheto informativo. Qualquer desvio de procedimento pode alterar os resultados.
- A interpretação dos resultados do teste deve ser efectuada tendo em conta o contexto clínico, a origem da amostra, os aspectos macro e microscópicos, e eventualmente, os resultados de outros testes.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- **Os frascos conservam-se entre 2°C e 30°C até ao prazo de validade.**
- Conservar em local seco.
- Os frascos devem ser cuidadosamente enroscados após cada utilização.
- O meio desidratado suporta um ciclo de 10 aberturas sucessivas do frasco.

AMOSTRAS

Este meio pode ser utilizado para a repicagem das estirpes fúngicas para obter culturas puras.

As amostras podem ser de qualquer natureza e são directamente semeadas por depósito na superfície da gelose.

É conveniente respeitar as boas práticas em termos de colheitas/coletas e de transporte, adaptadas a cada tipo de colheita/coleta.

PROCEDIMENTO**Preparação:**

1. Colocar, em suspensão, 45 g de pó em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.
2. Misturar cuidadosamente.
3. Aquecer até ebulição.
4. Distribuir em frascos ou directamente em tubos (na proporção de, aproximadamente, 6 ml por tubo).

- Autoclavar 15 minutos a 120°C.
- Deixar os frascos à temperatura ambiente durante, pelo menos, 15 segundos antes de os transferir para um banho-maria a 45° - 50° C. Manter os frascos a esta temperatura até ao momento da utilização. Distribuir os frascos em placas de Petri (na proporção de 18 a 20 ml por placa).
Deixar arrefecer os tubos em posição inclinada de forma a obter um declive.
- Utilizar os meios após reconstituição e arrefecimento da gelose.

Sementeira e incubação:

- Semear a amostra ou a estirpe/cepa a analisar.
- Incubar na estufa a 25° ou 37°C, com a tampa para baixo, as placas de Petri, e com a tampa desenroscada os tubos.
As culturas são examinadas, geralmente, após 48 a 72 horas de incubação para a pesquisa de leveduras. No caso de incubação a 37° C, as leituras podem ser efectuadas após 24 horas.
Para a pesquisa de fungos filamentosos, observar o crescimento após 3 dias de incubação.
Em alguns casos, é necessário prolongar a incubação. Para as placas de Petri, é recomendado proteger o meio da desidratação (jarras, saqueta/sachet, película de plástico aderente...).
A escolha da temperatura e a duração de incubação varia consoante o tipo de amostra e a natureza dos microrganismos cultivados. Estes parâmetros são da responsabilidade do utilizador em função da aplicação e das normas em vigor.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO

- Após incubação, observar o crescimento bacteriano.
- A identificação do(s) microrganismo(s) isolados deve ser efectuada por exame directo (macro e microscópico) ou por testes complementares (bioquímicos ou imunológicos).

CONTROLO DE QUALIDADE

Protocolo:

A fertilidade do meio pode ser testada em relação às estirpes/cepas seguintes:

- Candida albicans* ATCC® 10231
- Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 9533

Resultados esperados:

Estirpe/cepa	Resultados a 20° - 25° C	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	Crescimento em 3 dias	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC® 9533	Crescimento em 7 dias	Aspecto branco, penugento e estrelado

Nota:

É da responsabilidade do utilizador ter em conta a natureza da aplicação e a legislação local em vigor para a execução do controlo de qualidade (frequência, número de estirpes/cepas, temperatura de incubação...).

LIMITES DO TESTE

- O pH da gelose Sabouraud 2 pode diminuir durante o tempo de vida do produto. Foi verificado que esta diminuição não altera a actividade microbiológica.
- O desenvolvimento depende das exigências específicas de cada microrganismo. É, portanto, possível que algumas estirpes/cepas que tenham exigências específicas (temperatura, etc.) não se desenvolvam.
- Dependendo das amostras analisadas e consoante os microrganismos pesquisados, é recomendado associar a gelose Sabouraud 2 a dois meios selectivos.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL

O comportamento funcional da gelose Sabouraud 2 foi estabelecido com a apresentação em tubo (ref. 42037) com:

- 30 estirpes/cepas fúngicas: 10 leveduras, 10 bolores e 10 dermatófitos.
- 102 amostras de origem humana
 - 73 amostras de tipo LBA: expectoração, biópsias, líquidos broncoalveolares, bronco aspiração
 - 29 amostras de tipo pele e fâneros

O comportamento funcional da gelose Sabouraud 2 (SAB2) foi avaliada:

1. A partir de estirpes/cepas,

- Para as leveduras, após 1 a 7 dias de incubação a 37°C
- Para alguns bolores, após 1 a 7 dias de incubação a 37°C e para outros após 2 a 10 dias a 25°C
- Para os dermatófitos, após 3 a 21 dias de incubação a 25°C

Leveduras: 9 estirpes/cepas em 10 desenvolveram-se em 24 horas e a última após 3 dias de incubação a 37°C.

Bolores: as 8 estirpes/cepas incubadas a 37° C demonstraram um crescimento após 24 horas de incubação e as incubadas a 25°C após 2 dias de incubação.

Dermatófitos: as 10 estirpes/cepas desenvolveram-se após 3 dias de incubação a 25° C

O conjunto de fungos filamentosos tem um aspecto microscópico típico.

2. A partir de amostras clínicas, o comportamento funcional foi avaliado para:

- As amostras do tipo LBA, após 1 a 7 dias de incubação a 37° C e 2 a 10 dias a 25° C.
- As amostras de tipo pele e fâneros, após 3 a 21 dias a 25° C

A gelose Sabouraud 2 (SAB2) foi comparada com a gelose Sabouraud (SAB).

Em 102 amostras, 63 apresentaram resultados positivos em, pelo menos, um dos meios utilizados (SAB, SAB2 e meios de rotina¹):

- 41 com leveduras
- 39 com fungos filamentosos: 28 bolores e 14 dermatófitos foram isolados.

(¹ Meio de rotina incluindo um meio cromogénico e um meio selectivo recomendado : consultar o § limites.)

Fertilidade em relação às leveduras no tempo de leitura final:*Número de amostras positivas em leveduras*

Todas as amostras e todas as temperaturas	SAB	SAB2
	33	35

Fertilidade em relação a fungos filamentosos no tempo de leitura final:*Número de bolores e dermatófitos isolados*

Todas as amostras e todas as temperaturas confundidas	SAB	SAB2
Bolores	15	21
Dermatófitos	2	3
Total : Fungos filamentosos	17	24

Pigmentação das colônias de fungos filamentosos no tempo de leitura final:

Número de bolores e dermatófitos que apresentam uma pigmentação em conformidade com a descrita na literatura:

Número de fungos filamentosos com aspecto típico / Número total	Pelo menos, um dos 2 meios	SAB	SAB2
Bolores			
25°C (amostras do tipo LBA, pele e fâneros)	10/17	2/11	10/17
37°C (amostras do tipo LBA)	8/12	2/8	8/11*
Dermatófitos			
25°C (amostras de pele e fâneros)	1/3	0/2	1/3

* Exemplo de interpretação: Entre os 11 bolores que demonstraram um crescimento em SAB2, 8 tinham um aspecto macroscópico típico.

Nota: O comportamento funcional obtido com a gelose Sabouraud 2 em tubos demonstrou-se equivalente ao obtido com a mesma gelose distribuída em placas a partir de frascos.

As geloses Sabouraud 2 em tubo (ref. 42037), frasco (ref. 42066) e meio desidratado (ref. 51020) têm a mesma fórmula.

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Eliminar os reagentes utilizados e não utilizados, bem como os materiais descartáveis contaminados, em conformidade com os procedimentos relativos aos produtos infecciosos ou potencialmente infecciosos. É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

ATCC é uma marca utilizada, depositada e/ou registada, propriedade exclusiva da American Type Culture Collection

Brasil: Distribuído por bioMérieux Brasil, S.A. - Estrada do Mapuá, 491 - Jacarepaguá - R.J. - CEP 22710-261

CNPJ: 33.040.635/0001-71

Atendimento ao Consumidor Tel.: 0800-264848

Prazo de Validade, N° de Lote, N° de Registro de Ministério da Saúde e Responsável Técnico:

VIDE EMBALAGEM

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO L - Cultural methods for human pathogenic fungi - *J. Chron. Dis.*, 1957, vol. 5, p. 545-551.
2. HAZEN K.C. - New and emerging yeast pathogens - *Clin. Microbiol. Rev.*, Oct. 1995, vol. 8, n°4, p. 462-478.
3. LARONE D.H. - *Medically important fungi: a guide to identification* - 4^{ena} Ed., Elsevier, 2002.
4. ODDS F.C. - Sabouraud's agar - *J. Med. Vet. Mycol.*, 1991, vol. 29, p. 355-359.

QUADRO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
	Referência de catálogo
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Limites de temperatura
	Prazo de validade
	Código do lote
	Consultar as instruções de utilização
	Conservar em local seco



bioMérieux® SA
au capital de 12 029 370 €
673 620 399 RCS LYON

A bioMérieux e o logotipo azul são marcas utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais.

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

CE
Impresso em França

B. Preparação Meio RPMI 1640 R6504



RPMI-1640 MEDIUM

With L-Glutamine and Without Sodium Bicarbonate
Product Number **R6504**

Product Description

RPMI-1640 medium was developed by Moore et al., at Roswell Park Memorial Institute, hence the acronym RPMI. RPMI-1640 medium has been used for the culture of normal and neoplastic leukocytes

Components	g/L
L-Arginine [Free Base]	0.2
L-Asparagine [Anhydrous]	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine•2HCl	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	0.3
Glycine	0.01
L-Histidine [Free Base]	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine•HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine•2Na•2H ₂ O	0.02883
L-Valine	0.02
Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic Acid Hemicalcium	0.00025
PABA	0.001
Pyridoxine•HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine•HCl	0.001
Vitamin B12	0.000005
Calcium Nitrate•4 H ₂ O	0.1
Magnesium Sulfate [Anhydrous]	0.04884
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.0
Sodium Phosphate Dibasic [Anhydrous]	0.8
D-Glucose	2.0
Glutathione, Reduced	0.001
Phenol Red•Na	0.0053

Precautions and Disclaimer

REAGENT

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

Powdered media are hygroscopic and should be protected from moisture. The entire contents of each package should be used after opening. Preparing a concentrated solution of medium is not recommended as precipitates may form. Supplements can be added prior to filtration or introduced aseptically to sterile medium.

1. Measure out 90% of final required volume of water. Water temperature should be 15-20 °C.
2. While gently stirring the water, add the powdered medium. Stir until dissolved. Do NOT heat.
3. Rinse original package with a small amount of water to remove all traces of powder. Add to solution in step 2. NOTE: It may be necessary to lower the pH to 4.0 with 1N HCl to completely dissolve this product. After it has dissolved completely, the pH can be raised to 7.2 with 1N NaOH prior to the addition of sodium bicarbonate.
4. To the solution in step 3, add 2.0 g sodium bicarbonate or 26.7 ml of sodium bicarbonate solution [7.5%w/v] for each liter of final volume of medium being prepared. Stir until dissolved.
5. While stirring, adjust the pH of the medium to 0.1-0.3 pH units below the desired pH since it may rise during filtration. The use of 1N HCl or 1N NaOH is recommended.
6. Add additional water to bring the solution to final volume.
7. Sterilize immediately by filtration using a membrane with a porosity of 0.22 microns.
8. Aseptically dispense medium into sterile container.

Storage and Stability

Store the dry powdered medium at 2-8 °C under dry conditions and liquid medium at 2-8 °C in the dark. Deterioration of the powdered medium may be recognized by any or all of the following: [1] color change, [2] granulation/clumping, [3] insolubility. Deterioration of the liquid medium may be recognized by any or all of the following: [1] pH change, [2] precipitate or particulates, [3] cloudy appearance [4] color change. The nature of supplements added may affect storage conditions and shelf life of the medium. Product label bears expiration date.

Procedure

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Water for tissue culture use [W3500]

Sodium Bicarbonate [S5761] or

Sodium Bicarbonate Solution, 7.5% [S8761]

1N Hydrochloric Acid [H9892]

1N Sodium Hydroxide [S2770]

Medium additives as required

References

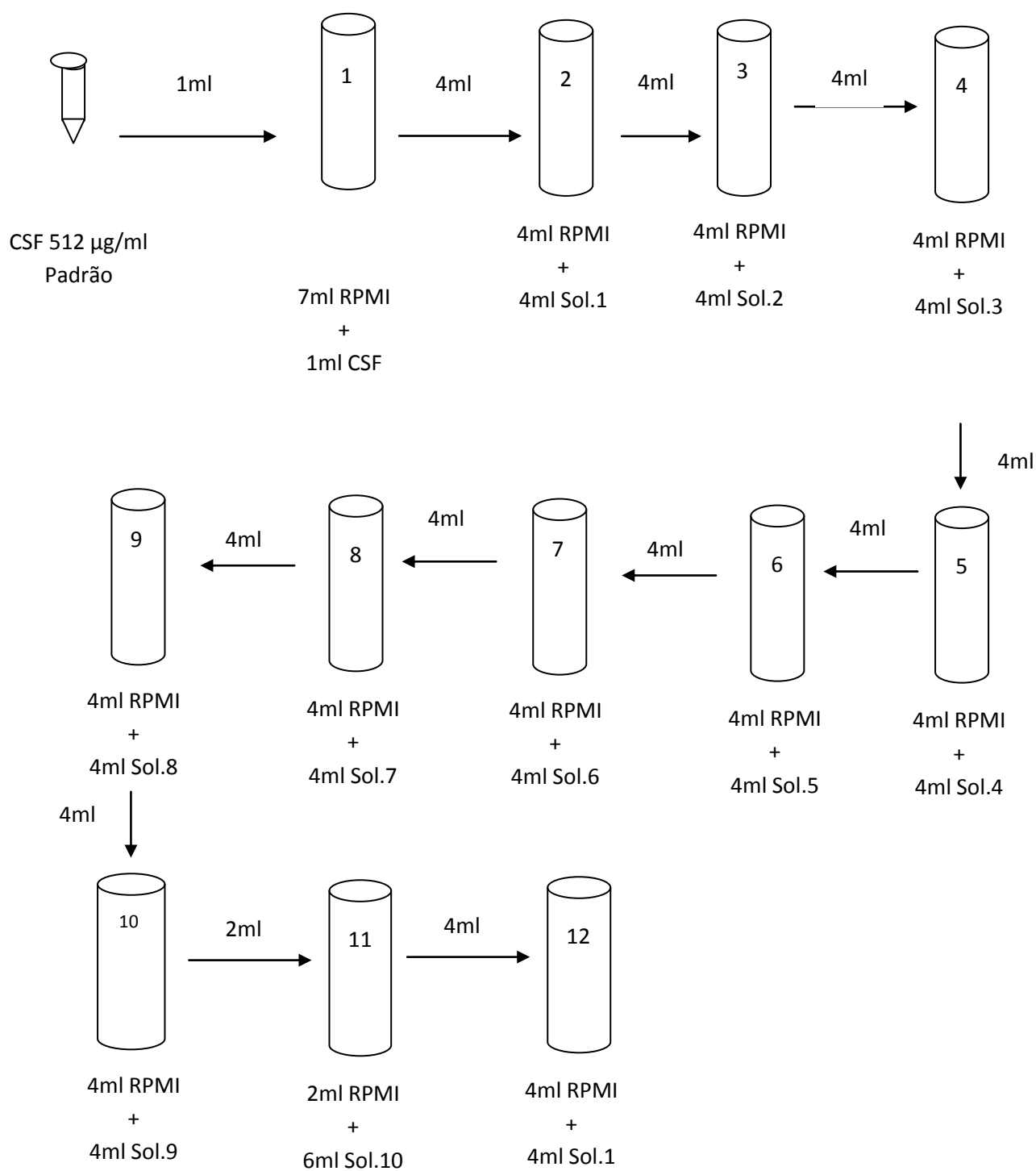
1. Moore, G.E., Gerner, R.E. and Franklin, H.A., (1967).
Culture of Normal Human Leukocytes. JAMA. 199, 519-524.

Revised: May 2007

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Sigma-Aldrich Inc.
3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technical Service: 800-325-5832 or call collect 314-771-5765
Or e-mail at techserv@sial.com
To order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

C. Esquema de Diluições Caspofungina-RPMI



Concentrações:

- | | |
|-------------|--------------------|
| 1- 64 µg/ml | 7- 1 µg/ml |
| 2- 32 µg/ml | 8- 0,5 µg/ml |
| 3- 16 µg/ml | 9- 0,25 µg/ml |
| 4- 8 µg/ml | 10- 0,125 µg/ml |
| 5- 4 µg/ml | 11- 0,03125 µg/ml |
| 6- 2 µg/ml | 12- 0,015625 µg/ml |

Distribuir 100 µl de cada uma das soluções nos respectivos poços e congelar a -80°C, até um máximo de 6 meses:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI								
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI								

D. Protocolo de Purificação de Produtos de PCR por Centrifugação

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

Quick
P R O T O C O L

DNA Purification by Centrifugation

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

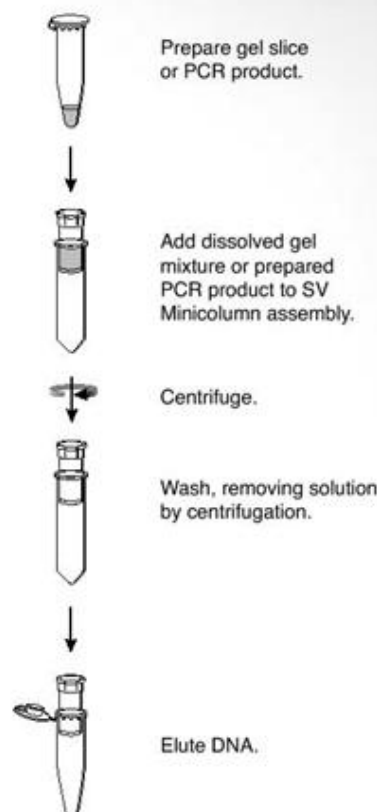
1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at $16,000 \times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at $16,000 \times g$ for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.



Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available online at: www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

© 2002, 2004, 2005 and 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Promega

Printed in USA. Revised 11/09
Part #9FB072

3750MA07_2A